N° d'enregistrement
au C.N.R.S : AO 1354

THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES SCIENCES NATURELLES

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES
de PARIS

par

J. ASSO

pour obtenir

Le grade de Docteur Es-Sciences

Sujet de la Thèse : Etude de quelques mutants du virus de la fièvre aphteuse

Soutenue le 26 avril 1967.

devant la Commission d'Examen

MM. LWOFF Président
DUBERT Examinateurs
PARAF

N° d'enregistrement
au C.N.R.S.
AO 1354

THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES SCIENCES NATURELLES

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES
de PARIS

par

J. ASSO

pour obtenir

le grade de Docteur Es-Sciences

Sujet de la Thèse : Etude de quelques mutants du virus de la fièvre aphteuse.

soutenue le

devant la Commission d'Examen

MM. LWOFF Président
DUBERT Examinateurs
PARAF

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

ETUDE DE QUELQUES MUTANTS DU VIRUS DE LA FIEVRE APHTEUSE

OBTENTION D'UNE SOUCHE VACCINALE UTILISABLE CHEZ LE BOEUF ET CHEZ LE PORC

J. ASSO

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534914_0003

A Monsieur Alain PARAF

Directeur de Recherches à l'I.N.R.A.

Nous tenons à remercier Monsieur le Professeur LWOFF qui a bien voulu présider notre Jury, qui a parrainé notre travail, nous aidant de ses conseils et de ses encouragements ;

Ainsi que Monsieur le Professeur DUBERT, qui nous a toujours témoigné beaucoup de sympathie, qui s'est intéressé à nos recherches et a accepté de juger cette thèse.

Que Monsieur PARAF veuille bien trouver ici l'expression de notre profonde reconnaissance, car nous lui devons de nous avoir enseigné - et fait aimer - la recherche, de nous avoir montré toute la valeur de ce métier et tous ses développements sur le plan scientifique et sur le plan humain. Bien des années de collaboration ont fait naître une profonde amitié qui a été pour nous-mêmes particulièrement enrichissante.

Il nous est agréable de témoigner ici de toute notre sympathie à nos collègues de la Station de Virologie et d'Immunologie de l'Institut National de la Recherche Agronomique et de leur rappeler ici la joie que nous avons eue de partager avec eux une ambiance de travail en équipe.

Nous voudrions exprimer une gratitude particulière à Monsieur DHENNIN et à Monsieur LUCAS du Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires d'Alfort qui ont favorisé et encouragé notre travail dès les premières heures.

P L A N

Pages

CHAPITRE I

Données récentes sur le virus aphteux

Le virus aphteux I

Techniques de sélection de mutants non pathogènes 9

CHAPITRE II

L'adaptation du virus aphteux de type O au lapin nouveau-né

Conditions d'adaptation I5

Etude de la maladie chez le lapereau de 8 jours I7

Propriétés du virus obtenu I9

Conclusion 22

CHAPITRE III

L'adaptation du virus aphteux au lapin adulte

Conditions d'adaptation 23

Etude de la maladie chez le lapin adulte 26

Propriétés du virus adapté au lapin adulte 30

Conclusion 45

CHAPITRE IV

Selection de mutants par passage en culture cellulaire

Techniques de sélection 47

Propriétés du virus obtenu en culture cellulaire 52

Conclusion

CHAPITRE V

Les clones préparés à partir du virus passé sur lapin puis en culture cellulaire

Préparation des clones 59

Etude des clones in vitro

La capside du virus 61

La replication du virus 72

Rapports entre les propriétés de la capside et les caractères du cycle viral 82

Etude des clones in vivo 84

Conclusion 87

CHAPITRE VI

Discussion

Les facteurs d'identification du virus aphteux O.163

Les facteurs d'identification qui se manifestent in vivo 89

Les facteurs d'identification qui se manifestent in vitro 90

L'apparition des facteurs d'identification en fonction de la technique de sélection des mutants non pathogènes 92

Les facteurs qui déterminent le pouvoir pathogène d'un virus aphteux 95

CHAPITRE VI (suite)

Conditions d'étude de la stabilité des mutants 98

L'immunisation par les mutants non pathogènes du virus aphteux I00

Développement de ces recherches . I03

CONCLUSION

Obtention des mutants non pathogènes .. I04

Les propriétés des mutants du virus aphteux

In vitro I05

In vivo I06

BIBLIOGRAPHIE

CHAPITRE I

DONNÉES ACTUELLES SUR LE VIRUS APHTEUX

I - LE VIRUS APHTEUX

A - Généralités

La fièvre aphteuse est une maladie très contagieuse, virulente et inoculable, qui affecte les animaux sauvages et domestiques à onglons (bovins, ovins, caprins, porcins) et se caractérise cliniquement par un état fébrile et une éruption de vésicules sur les muqueuses et sur la peau.

Historique

L'agent de la fièvre aphteuse est un virus du groupe Picorna qui a été découvert par LOEFFLER et FROSH (III) en I897. En I920, WALDMAN et PAPE (206) montrent la sensibilité du cobaye à l'infection expérimentale. VALLEE et CARRE (I97) en I922 déterminent la pluralité des types de virus aphteux. En I937, WALDMAN met au point un vaccin formolé et adsorbé qui est toujours employé dans la prophylaxie après avoir subi quelques améliorations (205) En I947, FRENKEL (84) obtient la culture du virus aphteux sur épithélium lingual bovin en survie. En I950, SKINNER (I69) réalise l'infection du souriceau nouveau-né et donne ainsi une technique de titrage simple du virus. En I955, SELLERS (I6I) et BACHRACH (2I) cultivent le virus aphteux sur cellules rénales de boeuf et de porc. En I958, BROWN (5I) et MUSSGAY (I25) extraient l'acide ribonucléique infectieux du virus. Depuis cette époque, de nombreuses équipes étudient les conditions d'obtention de mutants non pathogènes du virus aphteux : KOMAROV (I05), GRIBANOV (94), CUNHA (64), VERGE (203), SKINNER (I73), PALACIOS (I3I)

Les types de virus aphteux

On distingue sept types de virus ne présentant entre eux aucune immunité croisée et ayant une distribution géographique déterminée :

- les types O, A, C sévissent en Europe, en Asie, en Amérique du Sud et en Amérique Centrale ;
- Les types SAT_1 et SAT_2 et SAT_3 en Afrique, au Proche-Orient.

- le type Asia en Asie et en Israël.

Au sein de chaque type la sérologie distingue plusieurs sous-types (35, 67, I03, I59, I92, I93, 207, 2II) entre lesquels l'immunité croisée n'est pas absolue. Les différentes souches varient considérablement dans leur pouvoir pathogène : alors que certaines ne font apparaître que quelques aphtes fugaces sans atteindre l'état général de l'animal malade, d'autres provoquent une infection pouvant entraîner la mort. Dans les pays où la maladie est endémique, la forme clinique est souvent fruste (73, I67).

Techniques de mise en évidence du virus aphteux

Il existe deux sortes de techniques pour identifier le virus aphteux, mettant en jeu, les unes le pouvoir pathogène du virus et sa neutralisation par le sérum homologue, les autres le pouvoir antigène.

Pouvoir pathogène expérimental

- Inoculation aux animaux spontanément sensibles

Le boeuf et le porc sont inoculés par voie intradermique. Au point d'inoculation apparaît une vésicule, puis, dans les jours qui suivent, l'infection se généralise et d'autres aphtes apparaissent sur les muqueuses et la peau de l'animal. HENDERSON (IOI) titre une suspension de virus par voie intradermolinguale chez le boeuf en injectant une série de dilutions de la suspension en vingt points ; on détermine ainsi la dose infectante 50 % (DL_{50}) boeuf. Chez le porc, la couronne périunguéale et la sole plantaire constituent les points les plus favorables à l'inoculation du virus.

- Inoculation aux animaux de laboratoire

De très nombreuses espèces animales sont sensibles au virus aphteux, en particulier les mammifères nouveaux-nés. En pratique, on utilise surtout le cobaye adulte et le souriceau à

la mamelle.
Le cobaye (I) est inoculé par voie intradermoplantaire ; un aphte apparaît 24 heures plus tard au point d'injection du virus ; dans les jours qui suivent, l'animal subit une généralisation de l'infection et de nouveaux aphtes se manifestent sur les autres coussinets plantaires et dans la cavité buccale. Le déroulement de l'infection reproduit très fidèlement les évènements qui se passent chez les espèces naturellement sensibles.
Le souriceau nouveau-né (4 à 7 jours après la naissance) est inoculé par voie intrapéritonéale ; 24 à 48 heures après l'inoculation du virus il présente des signes de paralysie des muscles striés et meurt rapidement. Le souriceau (I79) est très sensible au virus aphteux et il est souvent employé pour le titrage des suspensions de virus ; l'évaluation de la dose léthale 50 (DL_{50}) souriceau permet de comparer différentes préparations de virus.

- Inoculation à des cultures cellulaires

Les cellules rénales de boeuf et de porc en explantation primaire (68, I04, I62) et de nombreux autres tissus de ces animaux (poumons, thyroïde (I75, 7I) d'embryons jeunes ou d' adultes, les cellules en lignée établie de rein de porc (96, I7I) et de Hamster (I4I, I77) dans lesquelles se multiplie le virus aphteux manifestent une dégénérescence au moment de la libération du virus. On peut donc définir ainsi une dose cytopathogène 50 (DCP_{50}) dans un système cellulaire déterminé.

- Les anticorps neutralisent le pouvoir pathogène du virus de type correspondant in vivo et in vitro. Ils sont présents dans le sérum des animaux guéris de la maladie expérimentale ou naturelle et dans le sérum des animaux immunisés (29, 42).

Pouvoir antigène du virus aphteux

Outre la précédente technique, le pouvoir antigène du virus aphteux se manifeste par la fixation du complément et par les

épreuves d'immunodiffusion.

- La fixation du complément (28, 36, 83, I87) permet d'identifier très rapidement le virus contenu dans l'épithélium de la langue du bovin, dans les tissus de souriceau, dans les liquides de culture cellulaire. C'est la technique de diagnostic et d'identification la plus employée. La technique de fixation du complément met en oeuvre du sérum de cobaye hyperimmun et du complément de cobaye ; l'évaluation au colorimètre du pourcentage d'hémolyse rend quantitative la lecture de la réaction et permet de distinguer différentes souches appartenant à un même type de virus.

- La diffusion en gélose d'une suspension du virus et du sérum homologue provoque l'apparition de deux lignes de précipité correspondant aux deux antigènes du virus (46, I99).

B - Propriétés physico-chimiques du virus aphteux

A partir des cellules infectées on peut extraire, concentrer et purifier le virus aphteux et étudier alors ses propriétés et sa structure (23, I48).

a) Les particules virales :

La centrifugation à 35000 tours/minute pendant 45 minutes sur SPINCO L 40 d'une préparation de virus permet d'isoler deux fractions: la composante D infectieuse, qui sédimente et fixe le complément ; la fraction U qui reste dans le surnageant, fixe le complément mais ne possède plus que 10^{-4} du pouvoir infectieux initial. Cette technique est très utilisée pour concentrer le virus (II, I2, 27).
La centrifugation du virus purifié, dans un gradient de sucrose ou de chlorure de césium, permet de déterminer que la particule infectieuse a un coefficient de sédimentation de I40 S tandis que la particule fixant le complément a un coefficient de sédimentation de I4 S (I46, I54, I55, I89, I90, I9I).

La chromatographie sur DEAE cellulose (37) sépare deux fractions identiques aux précédentes. Toutefois, l'adsorption dénature très souvent le virus de sorte qu'il est difficile de mettre en évidence son infectiosité après l'élution.
La diffusion en gélose permet d'attribuer à la particule légère un diamètre de 7 mμ (32), les deux types de particules coexistent dans les tissus infectés. La particule infectieuse se compose d'un acide nucléique et d'une capside protéique : elle mesure 25 mμ et en se désintégrant, perd son pouvoir infectieux sous l'action de différents facteurs (solutions acides "39, I23", chaleur "I5") ; elle produit alors la particule 7 mμ qui résulte de l'aggrégation d'un certain nombre de capsomères. Si l'on inhibe l'activité de la ribonucléase du milieu, on peut obtenir en même temps l'acide ribonucléique infectieux.
Au microscope électronique l'examen de préparations de virus aphteux concentré et purifié par centrifugation fait apparaître dans le surnageant, les particules 7 mμ et dans le culot, les particules 25 mμ (I8, 30, 3I, 33, I58) ; l'examen de photographies du virus selon la technique de MARKHAM permet de préciser que le virus possède 32 capsomères (34) et l'application de la technique de LURIA montre que chaque unité formant des plages correspond environ à 700 particules 25 mμ .

b) L'acide nucléique du virus aphteux

L'acide ribonucléique infectieux a été extrait par le phénol froid selon la technique de GIERER et SHRAMM (87) à partir de carcasses de souriceau, de culture cellulaire, ou de liquide vésiculaire, récoltés après la multiplication du virus (50, I25, I82). En I959, MUSSGAY (I23) et BROWN (39) montrent que l'exposition de suspension de virus à des solutions acides (pH 5) provoque l'ouverture des capsides et la libération du génome qu'il faut protéger de l'action des enzymes du milieu (I8I). En I960, BACHRACH (I5) chauffe le virus entre 52° et 58° en présence de dodecyl sulfate de sodium et isole l'ARN infectieux (I3, I4, 53). L'acide nucléique extrait du virus

provoque la dégénérescence des cellules de rein de porc en culture et tue le souriceau par voie intracérébrale ; il suscite l'apparition d'aphtes lorsqu'on l'inocule par voie intradermique chez le boeuf ou le cobaye (5I, 63). L'ARN est toujours beaucoup moins infectieux que la préparation de virus initiale : lors de son extraction, le rendement obtenu est inférieur à 10^{-4} même en solution hypertonique. Le virus que l'on recueille après l'inoculation de l'acide nucléique est de même type immunologique que le virus original (97, 98). Le pouvoir infectieux de l'acide nucléique est sensible à la ribonucléase (10 µ g/ml), au rayonnement ultraviolet (2537 Å), au formol à 0, 002%, à la chaleur (90°), à l'acétyl-éthylène-imine à 0, 05 % et à la β propiolactone (45, 73, 79, 8I, 82, 209), et n'est pas neutralisé par les anticorps spécifiques du virus. L'acide nucléique est constitué par les quatre bases dans le rapport : Guanine 0, 24, Adenine 0, 26, Cytidine 0, 28, Uracile 0, 22. Purifié, il a une constante de sédimentation de 35 S ce qui correspond à un poids moléculaire de 3.10^6 (23, II2, I78).
L'acide nucléique du virus absorbe la lumière de longueur d'onde 258 mµ , le rapport d'absorption $\frac{258}{230}$ est de 3, I., l'augmentation de la température fait varier l'absorption de la lumière par l'ARN viral : les diverses transitions dans le repliement de la chaîne de nucléotides donnent lieu au phénomène d'hyperchromie (Tm 57). Le repliement du brin d'ARN varie aussi avec la concentration des ions dans le milieu (µ Na^+ 0, 08 : Tm 57°, µ Na^+ 0,8 : Tm 74°) et BACHRACH montre également qu'à l'intérieur de la capside le brin d'acide nucléique a un degré de repliement qui le distingue de l'acide nucléique viral placé dans des conditions de milieu identiques (I6, I7).

c) La protéine de structure du virus aphteux et la particule 7m µ

La capside est détruite par la chaleur (I9) et les solutions acides (I2I, I56) par le phénol et le sodium dodecyl sulfate

à chaud (60, 8I, 82) et au moment de la décapsidation au niveau de la membrane cellulaire (I85). La protéine de structure est synthétisée dès la deuxième heure du cycle viral (2, 48) et peut former des groupes de sous unités, elle constitue alors la particule 7m μ qui est sensible à l'action de la trypsine et du fluorocarbone (38, 80, 8I, I46, I98). La particule 7m μ porte les sites antigéniques de précipitation lors de l'immunodiffusion, elle entre en compétition avec les particules 25 m μ au cours des réactions de séroneutralisation du virus (29). Le pouvoir immunigène de la particule 7m μ est très faible.

C - Le cycle de développement du virus aphteux

In vitro, le virus aphteux se multiplie dans de nombreux systèmes cellulaires :

- Cellules en survie : fragments de peau de cobaye (58, 99, I00, II7), épithelium lingual de boeuf (84, 9I, I94), embryome expérimental (I83, 72)

- Cellules en explantation primaire : cellules rénales de porc, de boeuf (20, 95, II0), de veau (I39, I64, I65, I95) ;

- Cellules de lignée établie : rein de porc (I4I), rein de hamster (57, II8, I22). L'étude du développement du virus en culture a permis de connaître les différentes étapes de son cycle de multiplication (I47).

- <u>L'adsorption et la pénétration</u> (43, 44, 45, 59, I84, I85).

L'adsorption se produit très rapidement (une à deux minutes), à 2° comme à 37°, aussi bien sur des cellules vivantes que sur des cellules tuées ou des débris cellulaires. Une quantité importante d'ions H^+ ou la présence d'anticorps spécifiques dans le milieu inhibent cette adsorption.
La pénétration dans la cellule n'a lieu qu'entre 25 et 40° sur des cellules vivantes ; cette phase est marquée par la

disparition de l'infectiosité du virus : la précipitation en gélose démontre l'absence de la ligne des 25 mμ et la persistance des particules 7mμ . Il se produit donc un clivage du virus en ses composants.

- La période de latence

Cette phase dure 90 à I00 minutes. Au cours de cette période ont lieu les synthèses des protéines virales enzymatiques et de structure et la synthèse de l'acide nucléique viral (2, 48) : la guanidine intervient pour empêcher la synthèse d'une ARN polymerase active (62, 75, I44, I50) ; la fluoro-phenylalanine inhibe le développement (49, I43) du virus en troublant la synthèse des protéines enzymatiques ; l'actinomycine D est sans effet sur l'incorporation de 32 P (40) dans l'acide ribonucléique synthétisé au cours de l'infection des cellules, ce qui montre que l'ARN cellulaire ne joue pas de rôle dans la multiplication du virus aphteux.
BROWN (4I, 47) et POLATNICK (2) ont mis en évidence l'existence d'une forme double brin de l'acide nucléique viral.

- Phase de production du virus

La libération du virus est précoce : tout le virus est produit entre la deuxième et la quatrième heure après l'infection des cellules. Chaque cellule produit de 50 à 200 unités infectieuses de virus (I45).

II - LES TECHNIQUES DE SELECTION DE MUTANTS NON PATHOGENES DU VIRUS APHTEUX

Le virus aphteux passé en série chez les rongeurs, dans l'oeuf embryonné ou en culture cellulaire peut, dans certaines conditions, perdre son pouvoir pathogène et conserver son pouvoir immunigène de sorte qu'il est possible d'obtenir des souches de virus susceptibles d'être utilisées comme vaccin vivant. Nous exposerons successivement les techniques mises en oeuvre dans ce but chez les diverses espèces expérimentalement sensibles et en culture cellulaire.

A - Isolement in vivo par passage chez les rongeurs

WALDMAN et PAPE (206) en I920 inoculent par voie intradermique dans le coussinet plantaire du cobaye du virus aphteux recueilli sur bovin ; ils notent l'apparition d'un aphte au point d'injection et, dans les jours qui suivent, la généralisation de la maladie, c'est à dire l'apparition de vésicules sur les trois coussinets plantaires non inoculés et sur la langue. Par passages en série sur cobaye, ils obtiennent des souches de virus beaucoup plus pathogènes pour le cobaye que ne l'étaient les virus d'origine ; cependant, ces virus restent pathogènes pour les bovins et les porcins.

NAGEL en I936 (I26, I27, I57, 200) propage une souche de virus aphteux par voie intracérébrale chez la souris et prépare ainsi un virus neurotrope pour la souris mais non aphtogène pour le boeuf.

SKINNER en I950 (I69) indique que le souriceau nouveau-né succombe après l'inoculation de virus aphteux par voie péritonéale et ses travaux permettent d'aborder quantitativement l'étude du virus puisque l'on peut réaliser facilement des titrages et des épreuves de séroneutralisation.

LIKHACHEV et GRIBANOV en I955 (94) montrent que l'infection du lapereau constitue une bonne technique de culture du virus

aphteux. En I958, CUNHA au Brésil (65,66), nous mêmes en France (203, 204) rapportons les mêmes résultats et réalisons des passages sur des lapins plus avancés en âge, obtenant après une centaine de passages la mort des lapins âgés de 50 à 90 jours avec d'intenses lésions musculaires et cardiaques. Le tableau I montre comment s'éffectue l'adaptation de trois souches de virus aphteux au lapin adulte en fonction du nombre de passages.

TABLEAU N° I

Passages en série de virus aphteux des trois types sur lapins de plus en plus âgés.

NUMERO D'ORDRE DES PASSAGES	AGE DES LAPINS EN JOURS		
	Souche C Loupoigne	Souche A	Souche O
I - 40	2 - 25	I - I5	I - 2
40 - 94	8 - 2I	20 - 60	5 - 70
95 -I37	39 - 60	90 et plus	40 - 90
I38 -I72	50 - 90		90 et plus

Les passages en série chez des lapins âgés permettent (I24) de préparer des quantités très importantes de virus (un lapin de 90 jours représente 300 grammes de muscles infectés titrant 10^7 DL_{50} souriceau) et entrainent une modification rapide du pouvoir pathogène.

Entre I958 et I960, divers auteurs ont ainsi obtenu des souches de virus aphteux très pathogènes pour le lapin adulte et non pathogènes pour le boeuf (I02, I36, I38, I80) ; ces souches de virus ont conservé tout leur pouvoir immunigène. Ultérieurement, des résultats identiques ont été publiés par SKINNER (I72, I74)

MACKOWIAK (II5, II6), UHLMAN (I96) et MASTAN (II9) pour des souches de virus adaptées à des souris adultes. Chez le boeuf ces virus sélectionnés in vivo se multiplient dans les muscles et en particulier dans le coeur provoquant, dans un certain nombre de cas la mort de l'animal et, le plus souvent, un trouble passager du rythme cardiaque (I53)

B - Isolement par culture dans l'oeuf embryonné

Il est difficile d'obtenir d'emblée la multiplication régulière du virus aphteux sauvage dans l'oeuf embryonné. Les premiers résultats positifs ont été obtenus grâce à l'emploi de souches de virus préalablement adaptées au cobaye ou à la souris. TRAUB et SCHNEIDER en I949 (I88) et d'autres auteurs (69, I28, I86) réalisent d'abord des passages alternés sur l'oeuf de poule et le cobaye avant de réussir plusieurs centaines de passages en série sur oeuf. SKINNER (I7I) en I960 a répété l'expérience avec plusieurs souches de virus d'abord passées sur souriceau (25). En I957, KOMAROV (I06) et GOLDSMIT (92) utilisent la voie intraveineuse chez l'oeuf embryonné de quatorze jours ; ils adaptent ainsi plusieurs souches de virus aphteux d'origine bovine ayant subi quelques passages chez le souriceau. Après avoir effectué plus de cent passages dans ces conditions, ils obtiennent des virus suffisamment inoffensifs pour être utilisés comme vaccin pour le boeuf.

En I960, PETERMAN (I42) à Lyon, obtient la multiplication dans l'oeuf d'une souche de virus aphteux cultivée au préalable sur fibroblastes de poulet in vitro.

Mais l'adaptation du virus au poussin d'un jour par GILLESPIE (88, 89, 90) et SKINNER (I70) semble être la technique de choix pour obtenir un virus capable de se développer dans l'embryon de poulet. Le virus aphteux est dans un premier temps passé quelques fois chez le poussin d'un jour par voie intradermique ou intramusculaire et provoque alors l'apparition de petites lésions surtout au niveau du coeur et du gésier : le virus obtenu sur poussin d'un jour peut alors être propagé par voie

chorioallantoïde dans l'oeuf.
PALACIOS et ZAHRAN (I29, I30, I32, 204) utilisent un virus passé cinquante fois ou cent fois sur poussin d'un jour pour inoculer des oeufs par voie intraveineuse ; ils obtiennent ainsi la mort de l'embryon et observent des lésions cardiaques. Le virus avianisé est utilisé au Vénézuéla.

C - Isolement en cultures cellulaires

Le développement du virus in vitro permet de lui faire réaliser de nombreux cycles de multiplication dans des conditions que l'on peut varier à volonté.
MAYR et WITTMAN en I960 (I20) ont obtenu la modification de plusieurs souches de virus aphteux en réalisant de très nombreux passages en série (450) sur des cellules de rein de veau. Les travaux de DUBES et de CHAPIN (77) puis ceux de LWOFF (II3, II4) sur le virus de la poliomyélite ayant montré que les mutants froids d'un virus sont dépourvus de pouvoir pathogène, divers auteurs (I08) ont fait varier les conditions du développement in vitro du virus aphteux : PRUNET (I52) en I964 cultive à 25° les trois types de virus aphteux sur cellules de rein de veau et obtient en 250 passages des virus qui ont perdu tout pouvoir pathogène pour les animaux naturellement sensibles.
MUSSGAY (I24) réalise des passages en série dans des conditions de pH acide qui ne permettent pas la multiplication des souches sauvages et prépare ainsi diverses souches modifiées du virus aphteux (22).
SEIBOLD (I60) observe qu'une partie des cellules de rein de veau en explantation primaire résiste à la multiplication du virus aphteux : il maintient les cellules à l'état d'infection chronique pendant I50 ou 200 jours en renouvelant périodiquement le milieu de culture et en réalisant des subcultures espacées de 30 jours les unes des autres. Le virus qui se multiplie dans ces conditions a perdu son pouvoir pathogène pour le boeuf (76, I66).

L'établissement de clones à partir des souches de virus modifié permet d'élaborer une population de virus qui a une certaine homogénéité puisque toutes les particules ont une origine identique. La stabilité des propriétés des virus clonés est plus facile à contrôler que celle des populations où se développent simultanément des virus qui peuvent être un peu différents les uns des autres. MCWAT (I2I), PRUNET (I52), ARMBRUSTER (86) ont ainsi préparé des souches de virus ayant pour origine une seule dose infectante à partir des souches de virus aphteux modifié (24).

D - Isolement par l'emploi successif de différentes techniques.

A l'heure actuelle, quel que soit le mode de sélection utilisé au départ, la plupart des virus sont propagés in vitro. Ainsi, nos souches de virus adaptées au lapin adulte ont été passées à 29° sur cellules de rein de porc (3, 8), les souches avianisées de KOMAROV et les souches murinisées de SKINNER ont été clonées sur cellules de rein de hamster (I40, I68). Les passages in vivo ou in ovo sont cependant importants car la stabilité des caractères antigéniques du virus est plus grande qu'in vitro et l'évolution du pouvoir pathogène au cours des passages in vivo et in ovo est plus facile à percevoir et peut être plus rapide.

E - Conclusions

Chaque technique de culture du virus aphteux permet de préparer des souches inoffensives pour les animaux naturellement sensibles: la propagation en série du virus chez les animaux de laboratoire, dans l'oeuf embryonné ou dans les systèmes de culture cellulaire convenables entraîne des modifications des propriétés originelles du virus, mais, le passage sur très jeune mammifère (souriceau, lapereau) ne fait guère disparaître

le pouvoir pathogène car le virus se multiplie de plus en plus intensément dans les muscles des jeunes animaux sans rien perdre de son effet pathogène pour le boeuf et pour le porc. Pour modifier rapidement les propriétés d'une souche de virus il faut changer peu à peu les conditions optimales de son développement : augmenter l'âge des animaux inoculés, incuber les cultures cellulaires à des températures différentes de 37° ou dans des milieux acides ou alcalins. L'isolement de clones à partir des souches de virus modifiés entraîne la production de virus dont toutes les propriétés sont identiques puisqu'ils ont pour origine un virion unique : cette homogénéité donne des garanties pour la stabilité du virus et elle permet d'utiliser avec plus de confiance les épreuves in vivo et in vitro destinées à mettre en évidence les marqueurs génétiques du virus (2I2).

C H A P I T R E I I

L'ADAPTATION DU VIRUS APHTEUX DE TYPE O AU LAPIN NOUVEAU NE

Après avoir décrit les conditions de l'adaptation nous rapportons les principaux traits de la maladie expérimentale chez le lapin nouveau né, puis les propriétés pathogènes et immunigènes du virus obtenu par passages sur animaux très jeunes.

I - CONDITIONS D'ADAPTATION

Le virus aphteux obtenu à partir d'épithélium lingual de bovin infecté artificiellement par une souche de type O pleinement virulente pour le boeuf.
Après broyage au mortier, on prépare une suspension de tissu dans une solution tamponée de PH 7,6.
Les lapereaux, allaités par leur mère et laissé en contact avec celle-ci, sont infectés par voie péritonéale à l'aide de la suspension de virus ; lorsqu'ils sont mourants on les sacrifie puis on prélève les muscles striés et le foie qui constituent le matériel infectant. Les tissus récoltés sont découpés, broyés au sable, et mis en suspension dans la solution tamponée ; on les centrifuge alors à faible vitesse après addition d'antibiotiques : la présence du virus dans le broyat est mise en évidence par inoculation au cobaye ou au souriceau nouveau-né.
Au cours des passages, on note la sensibilité particulière de certaines familles de lapins de sorte que l'on a intérêt à réaliser les passages ultérieurs dans la même portée. Après deux ou trois passages on obtient régulièrement la mort de tous les animaux âgés de moins de 48 heures au moment de l'inoculation.

L'adaptation se caractérise de deux manières :

I° - Alors que le virus d'origine bovine fait apparaître des signes cliniques chez seulement quelques animaux d'une portée, le virus ayant subi trois ou quatre passages chez le lapin nouveau-né provoque la mort de tous les animaux inoculés.

2° - L'évolution de la maladie devient plus rapide : l'incubation est de trois ou quatre jours lors des premiers passages ; elle n'est plus que de 24 heures lors des passages suivants. La durée

de l'incubation dépend alors de la teneur en virus de l'inoculum: les suspensions contenant 10^6 DL_{50} souriceau provoquent la mort du lapereau en I2 à I8 heures alors que celles qui en renferment 10^2 à 10^3 DL_{50} ne font apparaître des signes cliniques que 24 ou 48 heures après l'inoculation.

II - ETUDE DE LA MALADIE CHEZ LE LAPEREAU AGE DE MOINS DE HUIT JOURS

a) Evolution clinique après l'infection expérimentale :

Les animaux inoculés à l'aide d'une quantité de virus adapté au lapin (suspension de muscles infectés diluée au I/IOOO soit IO^2 ou IO^3 DL_{50} souriceau) conservent une activité normale au début de l'incubation. Les premières manifestations apparaissent après I8 ou 24 heures et consistent en une difficulté de locomotion et une flaccidité des muscles abdominaux. Ces signes s'accentuent avec le temps : les membres postérieurs ne sont plus ramenés sous le corps et la paralysie s'étend progressivement aux parties antérieures. 30 heures après l'infection, le lapereau est atteint d'une asthénie générale : il ne peut plus soulever la tête du sol, ses membres antérieurs sont rejetés latéralement, la respiration est saccadée puis dyspnéique et le sujet meurt 36 ou 48 heures après l'infection.

b) Anatomie pathologique :

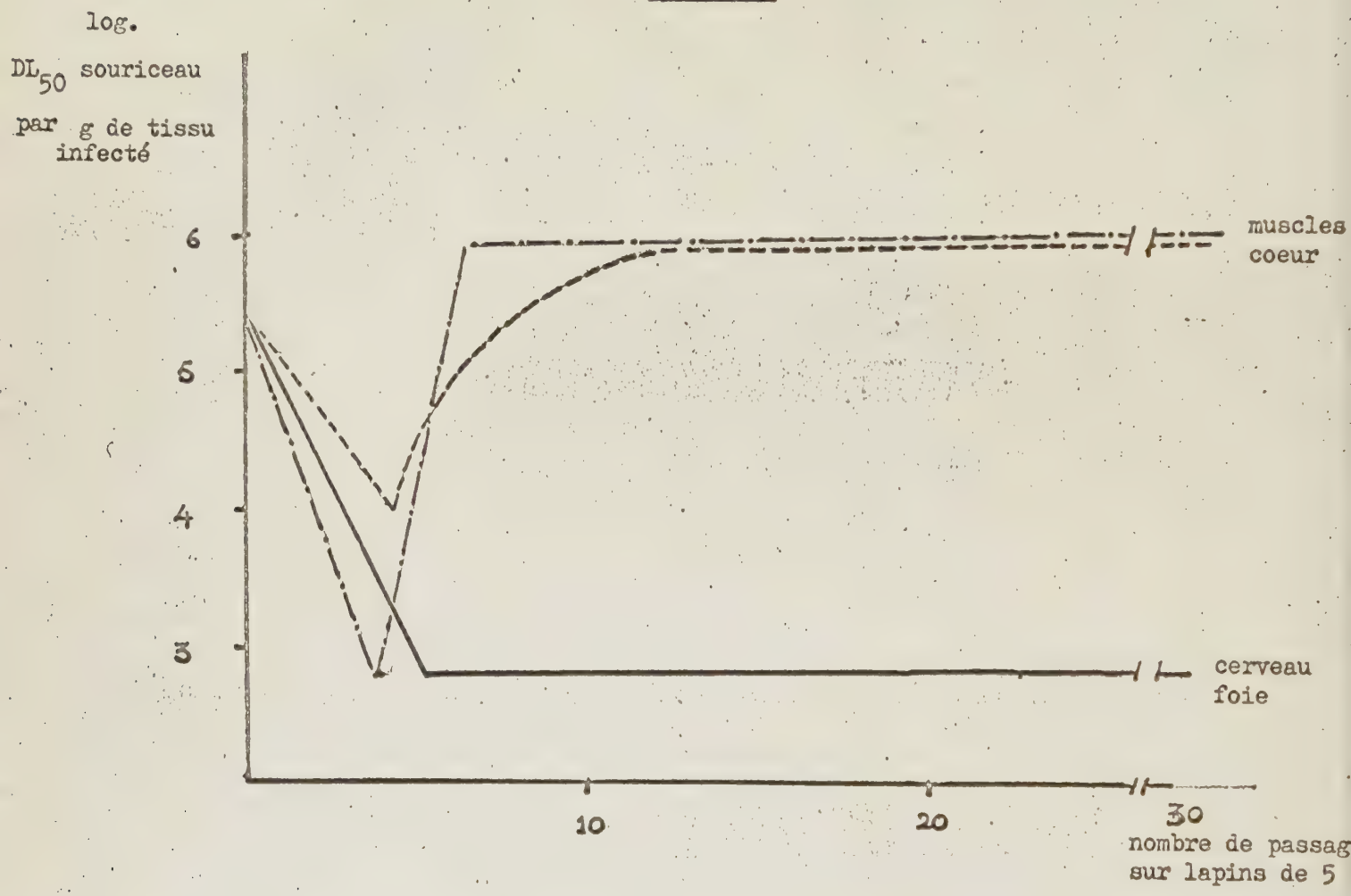
Les lésions observées sont rares lorsque la maladie évolue chez le jeune animal : la vessie est dilatée, l'estomac plein de lait; On peut noter parfois des pétéchies sur les muscles des lombes, des membres postérieurs et du diaphragme. Ces lésions apparaissent plus fréquemment avec un virus qui a subi de nombreux passages chez le lapin. Il n'y a jamais de lésion macroscopique au niveau des épitheliums ou du pancréas.

c) Repartition du virus chez le lapereau :

Après la mort du lapin infecté expérimentalement, nous avons recherché quels tissus contenaient le virus : chacun d'entre eux est broyé séparément au sable dans la solution tamponnée. Le virusaphteux est mis en évidence soit par inoculation dans le derme plantaire du cobaye ou par voie intrapéritonéale chez le souriceau nouveau-né, soit par fixation du complément. On voit

COURBE 1

Evolution de la teneur en virus des différents organes en fonction du nombre de passages sur lapin



Les tissus sont prélevés au moment de la mort de l'animal et l'on recherche par titrage sur souriceau de 4 jours leur teneur en virus. Il n'est pas possible de mettre en évidence des quantités de virus inférieures à 10^2 DL_{50} par gramme de tissu.

(Cf. Tableau 2) que le cerveau, la rate et le foie renferment à coup sur du virus et que le muscle, le pancréas et le poumon sont ceux qui en contiennent le plus.

TABLEAU N° 2

Teneur maximum en virus des divers tissus du lapereau infecté par le virus aphteux

Par gramme de tissu		
I0 DL_{50} souriceau	$I0^2$ DL_{50} souriceau	$I0^4$ - $I0^6$ DL_{50}
Peau	Cerveau	Muscle
Conjonctif	Rate	Poumon
Muqueuse intestinale	Foie	Pancréas
Graisse		
Thymus		
Moelle osseuse		

Le muscle et le pancréas sont le siège de la multiplication du virus, tandis que le poumon ne joue vraisembleblement que le rôle de filtre.

Nous avons évalué comment la répartirion du virus dans les différents tissus variait en fonction du nombre de passages (Cf.courbe I Tandis que le virus se multiplie mal au cours des premiers passages, à partir du dixième passage le virus se développe avec intensité dans les muscles striés et le cerveau. L'interprétation est délicate à exprimer dans le cas des tissus fortement irrigués (foie, rate, poumon) car les titres observés peuvent être dûs au virus transporté par le sang et non à une multiplication in situ.

III - PROPRIETES DU VIRUS OBTENU PAR PASSAGES SUCCESSIF SUR LAPIN NOUVEAU-NE

---

a) Le pouvoir pathogène

I° - Le pouvoir pathogène pour le lapin

Les lapereaux présentent une sensibilité maximum au virus entre le troisième et le cinquième jour après la naissance : inoculés alors qu'ils sont plus jeunes, leur réponse est irrégulière : la plupart des animaux succombent à l'infection s'ils sont âgés de cinq à trois jours au moment de l'injection de virus, mais les délais varient selon les individus ; pratiquée entre le 9ème et le I3ème jour, l'inoculation de IO^3 à IO^5 DL_{50} souriceau, par voie intra-péritonéale provoque une flaccidité des muscles abdominaux suivie du rétablissement progressif de l'animal. Si le lapin est âgé de plus de deux semaines, l'injection de virus ne suscite pas de réaction apparente.

Nous avons tenté d'obtenir la multiplication du virus adapté au lapereau chez le lapin adulte (I Kilo 500) : nous fondant sur le dermotropisme du virus aphteux, nous avons épilé et scarifié les flancs de l'adulte préablement à l'inoculation intraveineuse du virus : deux jours après, nous avons observé une congestion et un oedème au niveau de la zone épilée. On peut mettre en évidence le virus dans le derme de cette zone en inoculant un fragment de peau au souriceau ou au lapereau, mais le titre du virus est très faible et les passages en série d'adulte à adulte ont échoué : tout se passe comme si le virus se localisait dans les lésions cutanées mais s'y multipliait faiblement. Jamais les lapins adultes infectés n'ont présenté de lésion buccale ou de signés généraux. Le virus aphteux adapté au lapereau n'est donc pas capable de se multiplier dans l'organisme du lapin adulte.

2° - Le pouvoir pathogène pour le souriceau

Des titrages réalisés simultanément avec un "virus lapereau" chez des souriceaux âgés de quatre jours et chez de jeunes lapins du même âge, montrent que le pouvoir pathogène de ce virus est le même vis à vis des deux espèces, puisqu'un gramme de muscles de lapereau infecté contient 10^7 DL_{50} aussi bien pour le souriceau que pour le jeune lapin. La maladie évolue de la même façon et dans les mêmes délais, les mêmes titres de virus sont atteints dans les différents tissus où le virus se multiplie.

3° - Le pouvoir pathogène pour le cobaye

Le virus inoculé par voie intradermoplantaire fait apparaître un aphte au point d'inoculation en 18 à 24 heures. L'infection se généralise dans les jours qui suivent comme avec le virus sauvage.

4° - Le pouvoir pathogène pour le boeuf

Un gramme d'épithélium lingual de boeuf aphteux renferme $10^7 DL_{50}$ par titrage chez le boeuf et 10^6 DL_{50} par titrage chez le souriceau lorsqu'il s'agit de virus sauvage. Un gramme de muscles de lapereau infecté avec du virus ayant subi cinquante passages chez le lapin nouveau-né titre 10^7 DL_{50} par titrage chez le boeuf et 10^7 DL_{50} par titrage chez le souriceau. Chez le boeuf, le virus lapinisé suscite une maladie identique à la maladie naturelle.

Les propriétés pathogènes du virus adapté au lapereau sont rassemblées dans le tableau n° 3.

TABLEAU N° 3

Pouvoir pathogène du virus adapté au lapereau
(50ème passage)

Espèce	Pouvoir Pathogène	Teneur de I gramme de Muscle de lapereau
Boeuf	Généralisation	IO^7 DL_{50}
Souriceau	Mort	IO^7 DL_{50}
Cobaye	Généralisation	IO^5 DL_{50}
Lapin adulte	0	
Lapereau		
5 à 9 jours	Mort	IO^5 DL_{50}
9 à I3 jours	Maladie	IO^3 DL_{50}
Plus de I5 jours	0	

b) Le pouvoir antigène

Nous avons utilisé le muscle de lapereau infecté, d'une part comme antigène dans la réaction de fixation du complément et d'autre part, comme antigène suscitant la synthèse des anticorps neutralisants chez le boeuf et le cobaye.

I° - La fixation du complément :

Les constituants de la réaction sont, d'une part le broyat de muscle de lapereau dilué au $\frac{I}{IO}$ en sérum physiologique, deux ou trois unités de complément standard et un sérum de cobaye hyperimmum servant d'anticorps spécifique.

La mise en évidence du virus aphteux dans les muscles du lapereau n'est pas directement réalisable de façon constante par cette technique.

2° - Le pouvoir neutralisant des anticorps suscités par le virus adapté au lapereau :

On peut mettre en évidence dans le sang des bovins infectés par le virus O adapté au lapereau des anticorps capables de neutraliser spécifiquement le virus aphteux bovin de type O. Le contact in vitro du sérum de boeuf et du virus en quantité convenable provoque une perte d'infectiosité que l'on peut mettre en évidence sur souriceau ou sur culture cellulaire ; les anticorps neutralisants apparaissent dès le septième jour dans le sang des bovins infectés et persistent plus de six mois à un titre élevé : en effet I ml de sérum prélevé I80 jours après l'infection neutralise IO^5 DL_{50} souriceau de virus. Le tissu de lapin infecté par le virus aphteux peut être utilisé comme antigène dans la préparation des vaccins inactivés par le formol, la chaleur, et l'absorption sur hydroxyde d'aluminium, ce qui confirme les travaux russes.

CONCLUSION

Le virus aphteux adapté au lapereau diffère donc du virus sauvage essentiellement par son pouvoir de multiplication dans les muscles du lapereau et du souriceau. Cette adaptation ne s'accompagne d'aucune modification du pouvoir pathogène pour le boeuf et pour le cobaye.

La spécificité de type du virus reste lamême : la structure antigénique ne change pas ainsi que le prouve la fixation du complément et la séroneutralisation vis à vis des virus d'origine bovine.

C H A P I T R E I I I

L'ADAPTATION DU VIRUS APHTEUX AU LAPIN ADULTE

Le virus adapté au jeune lapin peut être inoculé avec succès à des animaux de plus en plus âgés : après avoir exposé comment nous avons réalisé ces passages en série nous décrirons les propriétés biologiques qui caractérisent le virus lapinisé.

I - CONDITIONS D'ADAPTATION

Le matériel virulent est constitué par un broyat de muscles de lapereau mort ou sacrifié après l'infection expérimentale. Le broyat est mis en suspension au I/IO dans une solution tamponnée à pH 7,6 et centrifugé à vitesse lente. Il est important de maintenir le pH de la suspension de virus au dessus de 7, car le virus aphteux est instable en milieu acide et la destruction des cellules musculaires provoque la libération de substances très acides. La suspension de virus, contenant au moins IO^5 DL_{50} souriceau par millilitre, est inoculée au lapin par voie intrapéritonéale à raison de 3 à 5 ml par animal.

Pour adapter le virus à une famille de lapins il convient de réaliser le premier passage chez un individu âgé de moins de IO jours. Les passages suivants sont effectués sur les animaux de la même portée : l'âge des lapins qui reçoivent le virus augmente ainsi au fur et à mesure des passages et comme le nombre moyen de lapins dans une portée est de huit, on peut réaliser successivement cinq ou six passages chez les lapins issus d'un même croisement (tableau 4 "page 24") ; on arrive ainsi à provoquer des signes cliniques chez des animaux de plus en plus âgés. Lorsqu'on change de portée il faut inoculer le broyat à un lapereau âgé de IO jours. Les muscles infectés d'un lapin âgé de 40 jours tuent son frère âgé de 45 jours, mais le même broyat est incapable de provoquer la maladie chez un individu plus jeune appartenant à une autre portée (le tableau 4 présente un schéma expérimental de ce genre). Nous n'avons aucune interprétation satisfaisante de ce fait qui conditionne cependant toute la technique de passage de virus sur animaux d'âge croissant.

TABLEAU N° 4

TECHNIQUE DE PASSAGE DE VIRUS APHTEUX A L'INTERIEUR D'UNE PORTEE DE LAPINS ET D'UNE FAMILLE A L'AUTRE

n° passage	FAMILLE A naissance le I.7.60		FAMILLE B naissance 3I.7.60		FAMILLE C naissance I0.9.60	
	date passage	âge	date passage	âge	date passage	âge
60	I0/7/60	I0 j.				
6I	I5/7/60	I5 j.				
62	20/7/60	20 j.				
63	25/7/60	25 j.				
64	30/7/60	30 j.				
65	4/8/60	35 j.				
66	9/8/60	40 j.	I0/8/60	I0 j.		
67			20/8/60	20 j.		
68			25/8/60	25 j.		
69			30/8/60	30 j.		
70			I0/9/60	40 j.		
7I			I5/9/60	45 j.	20/9/60	I0 j.
72					25/9/60	I5 j.
73					I/I0/60	20 j.

La quantité de virus inoculée par voie intrapéritonéale est toujours la même : I/I00 gramme de muscles infectés dans 2 ml de solution tamponnée, ce qui correspond à $I0^5$ DL_{50} souriceau. Les lapins meurent 3 jours après l'inoculation mais les passages ne sont réalisés que tous les 5 jours, ce qui permet d'avoir une différence d'âge plus marquée d'un animal à l'autre. Ce délai est mis à profit pour titrer le muscle infecté sur souriceau.

Dès le 60ème passage nous avons pu infecter des animaux âgés de plus de deux mois : nous avons alors inoculé chaque fois 8 à IO animaux âgés de 2 à 4 mois (pesant I,500 Kg) sans lien de parenté. Certains ne présentent aucun signe d'infection et sont rejetés ; d'autres présentent des signes cliniques et des lésions pathognomoniques, et leurs muscles sont utilisés pour préparer le passage suivant. Cette conduite de l'expérimentation est rendue indispensable parce que l'entretien de nombreuses portées de lapins pendant de longues périodes est difficile et onéreux, mais elle suscite de nombreux obstacles lorsqu'on veut réaliser rapidement des passages de virus sur des lapins d'âge croissant.

II - ETUDE DE LA MALADIE CHEZ LE LAPIN ADULTE

a) Evolution clinique après l'infection expérimentale

Après 48 heures d'incubation le lapin se déplace difficilement, ses flancs se creusent, les muscles abdominaux sont flasques. Progressivement l'animal ne peut plus porter sa tête et la laisse reposer entre ses pattes antérieures et la mort survient brusquement 3 jours après l'infection,(73, I36)

b) Anatomie pathologique :

Les lésions sont localisées au niveau des muscles striés et du coeur. Les muscles gastrocnémiens et le diaphragme, dont le fonctionnement est intense chez le lapin, sont le plus massivement atteints mais l'on trouve aussi de nombreuses lésions de dégénérescence au niveau de la paroi abdominale, des muscles lombaires, des cuisses et du cou. Dans un premier temps apparaissent des pétéchies qui font place à des stries blanchâtres orientées dans le sens des fibres musculaires ; ces lésions peuvent intéresser la totalité d'un muscle qui apparaît alors uniformément dégénéré et de couleur mastic. Au niveau du coeur les lésions dégénératives prennent un aspect étoilé ; les ventricules apparaissent striés et on retrouve les mêmes lésions au sein du myocarde.

c) Cinétique de la multiplication et répartition du virus (70)

Nous avons recherché le virus dans les différents tissus après l'infection, en sacrifiant des groupes d'animaux d'âges divers, à intervalles réguliers, au cours de la période qui précède les premières manifestations cliniques. Les tissus où nous avons recherché le virus sont : les muscles striés lombaires, le

diaphragme, les gastrocnémiens, le coeur, le cerveau, le sang ou la rate. La teneur en virus est évaluée par inoculation de dilutions de broyat des différents tissus au souriceau. L'inoculum est constitué par un broyat de muscles de lapin adulte titrant 10^6 DL_{50} souriceau par gramme. Les lapins sont inoculés par voie péritonéale, la quantité de virus à injecter pour provoquer l'infection mortelle variant avec l'âge du lapin. Une dose léthale souriceau tue le lapin âgé de 4 jours ; il en faut 10^4 pour tuer un lapin de 20 jours et 10^5 pour un lapin de trois livres.

Une période silencieuse, correspondant aux premières phases de l'infection, d'une durée variable selon l'âge des animaux inoculés, précède l'apparition du virus. Cette période est de 24 heures chez le lapin âgé de 4 à 20 jours et de 36 heures chez l'animal de I,500 Kg.

Dans tous les cas le virus est décelable dans le diaphragme à partir de la 24ème heure ; 3 à 6 heures plus tard on en trouve dans le sang et dans les muscles des jambes qui présentent quelques lésions hémorragiques punctiformes ; le titre du virus s'élève dans les muscles striés jusqu'à la mort de l'animal (cf. tableau 5).

TABLEAU N° 5

CINETIQUE DE LA MULTIPLICATION DU VIRUS APHTEUX CHEZ DES LAPINS D' AGES DIFFERENTS

Animal, Dose de l'inoculum	Temps du prélèvement après l'inoculation du virus	Titre en DL_{50} souriceau des tissus infectés				
		Diaphragme	Gastrocnémien	Coeur	Cerveau	sang ou rate
Lapin âgé de 4 j. 10^{0} DL_{50}	6 h					
	18 h					
	24 h	10^{2}				
	30 h	10^{4}	10^{2}	10^{0}	0	10^{0}
	36 h	10^{6}	10^{5}	10^{2}	10^{0}	10^{2}
	42 h (mort)	10^{6}	10^{6}	10^{2}	10^{0}	10^{2}
Lapin âgé de 20 j. 10^{4} DL_{50}	24 h	10^{0}	0	0	0	0
	30 h	10^{4}	10^{2}	10^{0}	0	0
	36 h	10^{6}	10^{6}			
	42 h	10^{6}	10^{6}	10^{2}	10^{0}	10^{2}
	48 h (mort)	10^{6}	10^{6}	10^{2}	10^{0}	10^{2}
Lapin âgé de 90 j. 10^{5} DL_{50}	36 h	0	0	0	0	0
	42 h	0	0	0	0	0
	48 h	10^{0}	0	0	0	0
	60 h	10^{4}	10^{4}	10^{2}	10^{0}	10^{0}
	72 h (mort)	10^{6}	10^{6}	10^{5}	10^{0}	10^{2}

Le coeur ne semble pas être le siège de la multiplication du virus chez les animaux jeunes : la quantité de virus est identique à celle que l'on trouve dans le sang. Par contre chez les lapins de I,500 Kg le coeur contient plus de virus que le sang.

La teneur du cerveau en virus semble liée à la présence de sang véhiculant des particules virales qui se sont multipliées au niveau d'autres tissus.

Il semble donc que le siège de la multiplication du virus soit les muscles striés du lapin. La présence du virus dans d'autres tissus peut toujours être rapportée à la virémie qui résulte de la libération du virus par les cellules infectées.

Les lapins de 4 à 20 jours meurent en 48 heures en présentant dès la 36ème heure des signes cliniques caractéristiques. Chez les lapins de I,500 Kg qui meurent en 72 heures les premiers signes cliniques et histologiques ne sont décelables que 48 heures après l'infection.

III - PROPRIETES DU VIRUS ADAPTE AU LAPIN ADULTE

a) Le pouvoir pathogène

I - Le pouvoir pathogène pour le souriceau

Le souriceau de 4 à 6 jours est très sensible au virus aphteux et nous l'avons employé pour titrer le virus lapinisé. Les broyats de muscles infectés sont dilués en fonction logarithmique dans une solution tamponnée de pH 7,6 et inoculés sous volume de 0,I ml par voie péritonéale. La voie intramusculaire peut aussi être utilisée ainsi que la voie intracérébrale ou intraveineuse, mais les quantités de suspension infectante que l'on peut alors injecter sont beaucoup plus faibles (0,03 ml) ce qui rend plus importantes les erreurs de dosage. Quelle que soit la voie utilisée la sensibilité de la technique est pratiquement la même.

Un souriceau qui a reçu IO DL_{50} de virus par voie intrapéritonéale ne présente aucun signe clinique pendant 36 heures, son attitude est normale ainsi que son appétit.

L'infection se manifeste d'abord par une flaccidité des muscles de l'abdomen : les animaux ont les flancs creusés ; vers 40 heures après l'inoculation ils présentent des difficultés ambulatoires qui peuvent se localiser à un seul membre antérieur ou postérieur ; très souvent les doigts sont écartés les uns des autres et l'animal ne peut plus les utiliser pour prendre appui. Après 48 heures, l'animal est vraiment paralysé et il meurt les membres en croix.
Un souriceau qui reçoit IO^3 ou IO^4 DL_{50} de virus meurt en 24 heures après une brève évolution clinique. Si la dose administrée est plus importante, l'animal meurt en I2 à I8 heures sans signe particulier. A IO DL_{50} près les souriceaux de toutes les lignées sont sensibles de la même façon au virus lapinisé. Si l'on prend

la précaution d'éliminer systématiquement les mères qui ont été en contact avec une portée infectée, toutes les femelles produisent des souriceaux de sensibilité équivalente : nous avons réalisé plusieurs contrôles en titrant la même suspension de virus dans des portées différentes ou dans des lots d'animaux provenant de différentes portées allaités par une seule mère.

La sensibilité des animaux très jeunes (moins de 3 jours) ou en mauvais état (mal nourris, diarrhéiques, présentant des troubles nerveux) est moindre que celle des animaux normaux. La sensibilité des animaux diminue avec l'âge : vers le 8ème jour après la naissance les souriceaux résistent à l'inoculation de IO à IOO DL_{50} souriceau ; certains présentent des signes de parésie qui s'atténuent et disparaissent en 3 ou 4 jours. Selon la lignée à laquelle appartiennent les jeunes souris le pouvoir pathogène du virus aphteux disparaît plus ou moins vite: c'est ainsi qu'à l'âge de I5 jours un souriceau C_3H ou Swiss supporte l'injection de IO^3 DL_{50} de virus lapinisé, alors que des souriceaux Balb/c ou C_{57} Black/6 présentent des signes cliniques et meurent en 2 ou 3 jours.

Les cadavres de souriceaux sont très riches en virus, en particulier le thorax (côtes, muscles intercostaux, coeur, poumon, diaphragme) titre de IO^7 à IO^8 DL_{50} souriceau par gramme de tissu ; le cerveau et les muscles striés contiennent aussi du virus et l'on peut observer des lésions hémorragiques pétéchiales au niveau des muscles des cuisses. Le sang des souriceaux prélevé par ponction cardiaque au moment de l'apparition des signes cliniques ou au moment de l'agonie présente un haut titre d'infection.

2 - Le pouvoir pathogène du virus lapinisé pour la souris adulte.

Dès le 30ème passage sur lapin le virus aphteux de type O devient capable de tuer les souris âgées de 50 jours.(I33). L'acquisition de cette propriété est l'une des premières manifestations

des changements subis par le virus. La sensibilité des animaux varie beaucoup selon la lignée : à la suite de l'injection de virus lapinisé les souris C_{57} Black/6 et Balb/C présentent des signes cliniques et meurent, les souris Swiss et C_3H restent en parfait état.

Les souris C_{57} Black/6 et Balb/C âgées de 30 à 90 jours meurent 4 jours après l'inoculation de IOO DL_{50} souriceau de virus ; la mort des animaux est précédée de manifestations cliniques très voisines de celles que l'on observe chez le lapin. Les souris Swiss et C_3H présentent une résistance qui s'accentue avec l'âge : les animaux âgés de 30 jours n'offrent aucun signe d'infection même si on leur injecte IO^4 DL_{50} souriceau ; si on leur inocule IO^6 DL_{50} souriceau de virus à peu près le I/5 d'entre eux meurt tandis que les autres paraissent indifférents.

TABLEAU N° 6

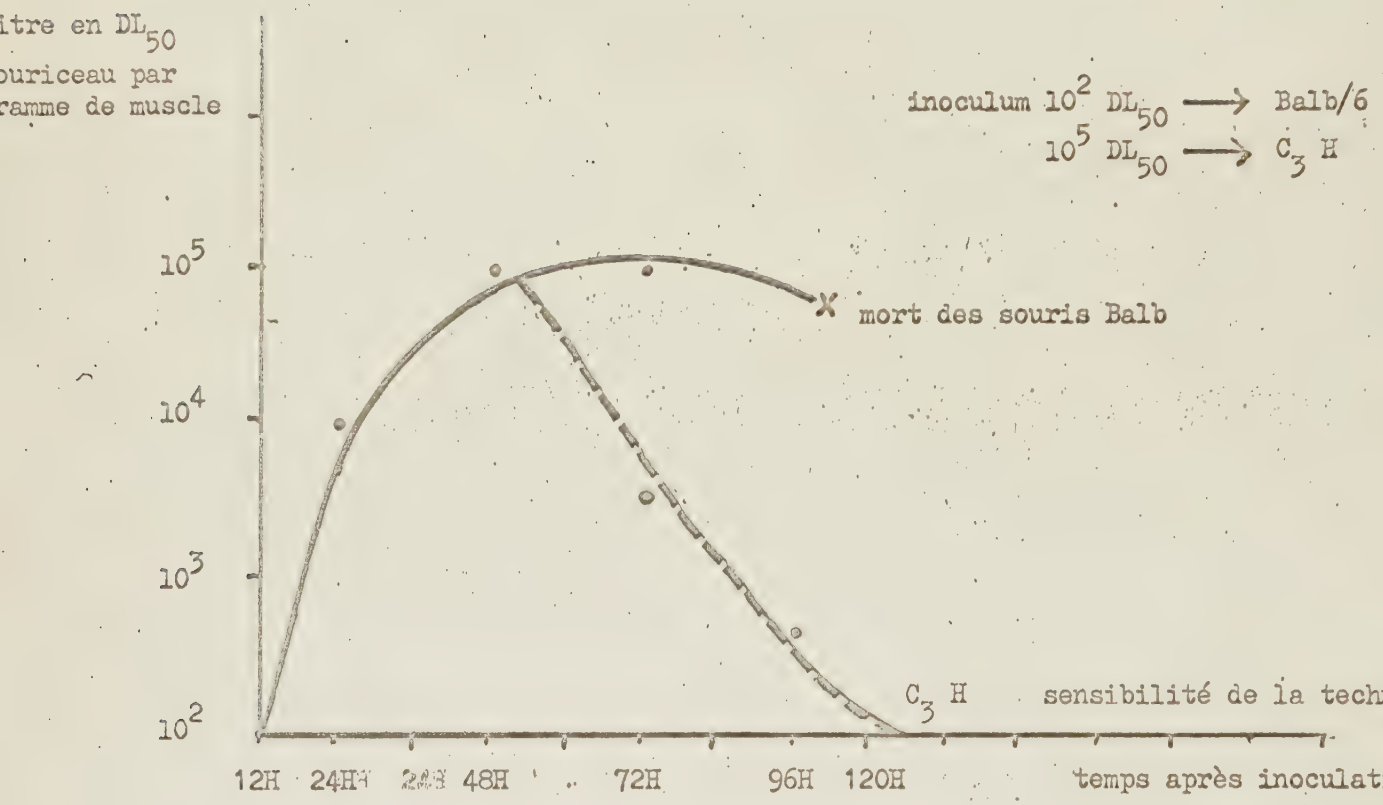
Pouvoir pathogène du virus lapinisé pour la souris adulte
Détermination de la DL_{50} en fonction de la souche de souris

Souche de souris	Age	Quantité de virus suscitant la mort (en DL_{50} souriceau)
C_{57} Black/6	30-90 jours	IOO
Balb/C	30-90 jours	IOO
Swiss	30 jours	IO^6
C_3H	30 Jours	IO^6

Nous avons voulu comparer le déroulement de l'infection chez les souris qui présentent des signes cliniques intenses et parmi les lignées qui font une maladie inapparente. Pour obtenir la multiplication du virus nous avons injecté IO^6 DL_{50} souriceau de virus lapinisé à 50 souris C_3H âgées de 6 semaines et IO^2 DL_{50} à 28 Balb/C de même âge. Nous avons recherché le virus

COURBE 2

Cinétique de la multiplication du virus O lapinisé chez les souris Balb/6 et C_3 H



Les souris sont sacrifiées à intervalles réguliers après l'inoculation du virus.
Les muscles des lombes sont broyés et l'on évalue par titrage sur souriceau leur teneur virus. On ne peut déceler par cette technique les quantités de virus inférieures à 10^2 D de tissu infecté.
Les souris C3H reçoivent 10^3 DL_{50} souriceau : on obtient une courbe de dégradation du v

dans le sang des animaux (I33) après l'infection en les sacrifiant à intervalles de temps réguliers à partir de la I2ème heure et nous avons titré le virus dans les muscles de la carcasse. Nous avons ainsi obtenu une courbe de la multiplication du virus chez les 2 souches de souris en fonction du temps écoulé depuis l'inoculation (cf. courbe 2)

La cinétique de l'infection est la même dans les deux groupes d'animaux : on retrouve du virus vers la I2ème heure avec le titre maximun à 48 heures ; le titre du virus est identique chez les souris Balb/C et C_3H mais seules les Balb succombent. Il convient de noter que l'on ne retrouve jamais chez la C_3H plus de 10^5 DL_{50} de virus par gramme de tissu ce qui est peu différent de la quantité de virus inoculée : on peut donc se demander si l'on a vraiment une multiplication du virus ou si l'on observe seulement la diffusion du virus injecté.

Le pouvoir pathogène pour la souris adulte permet de différencier les virus sauvages des virus aphteux ayant subi plusieurs passages chez le lapin (9).
Ce caractère persiste même après la multiplication du virus chez le boeuf : trois jours après l'inoculation du virus dans la langue du boeuf non seulement les aphtes mais aussi le sang de l'animal et certains muscles (masseters) contiennent suffisamment de virus "lapinisé" pour tuer la souris adulte C_{57} Black/6 ou Balb/C (IO). Le pouvoir pathogène pour la souris adulte est un facteur d'identification du virus aphteux adapté au lapin.

3 - Le pouvoir pathogène pour le cobaye

Le pouvoir pathogène du virus aphteux pour le cobaye de 500 grammes peut être éprouvé par la voie intradermique au niveau des coussinets plantaires, par les voies intramusculaire, intrapéritonéale ou intraveineuse.
L'injection du virus aphteux lapinisé dans le derme provoque l'apparition d'un aphte au point d'inoculation ; puis la maladie

se généralise et l'on retrouve des aphtes au niveau des coussinets plantaires non inoculés et au niveau de la langue. Le pouvoir infectieux du virus lapinisé est très faible : il faut 10^5 DL_{50} souriceau pour provoquer de telles lésions et si l'on inocule des broyats moins riches en virus le cobaye ne présente aucune lésion aphteuse.
Le virus aphteux lapinisé injecté par voie intrapéritonéale provoque l'apparition en 3 ou 4 jours de lésions spécifiques sur les coussinets plantaires.
Le virus inoculé par voie intramusculaire suscite au point d'inoculation des lésions en stries blanchâtres assez semblables à celles que l'on observe chez le lapin ; il est rare d'obtenir des vésicules sur les muqueuses ou le derme de l'animal.
Très souvent les cobayes meurent à la suite de l'infection par le virus lapinisé quelle que soit la voie d'inoculation et l'on retrouve à l'autopsie des lésions cardiaques du type "coeur tigré" décrit par Kitt.
Le pouvoir aphtogène pour le cobaye diminue à mesure que le virus se multiplie chez des lapins plus âgés ; en même temps sa capacité de multiplication dans les muscles du cobaye et son cardiotropisme augmentent.

4 - Le pouvoir pathogène du virus aphteux lapinisé pour le bovin.

Nous avons effectué, au cours des passages en série du virus sur le lapin, d'une part des titrages par voie linguale selon la technique de Henderson (101) et d'autre part des inoculations par diverses voies chez des bovins adultes (2 à 6 ans) en provenance du Finistère (n'ayant pas été vaccinés ni infectés par le virus, donc sans anticorps spécifiques).

- Evolution du titre infectieux du virus pour le boeuf au cours des 130 passages sur lapin (137) :

Le virus inoculé est une suspension de tissu musculaire de lapin dans une solution tamponnée de pH 7,6. Nous utilisons des

dilutions logarithmiques I/IO, I/IOO, I/IOOO ... en administrant à chaque bovin dans la langue par voie intradermique 4 dilutions de virus en 20 points ; les résultats expérimentaux permettent de déterminer la DL_{50} pour le boeuf de chacune des suspensions de virus ; chacun des titrages est réalisé sur 4 ou 5 bovins.

TABLEAU N° 7

Modification du pouvoir pathogène du virus aphteux pour le boeuf en fonction du nombre de passages sur le lapin (quantité de virus contenue dans un gramme de muscle de lapin infecté)

N° de passage sur lapin	Titre souriceau	Titre boeuf
Virus sauvage	IO^6 DL_{50}	IO^7 DL_{50}
5ème passage	IO^4 DL_{50}	IO^7 DL_{50}
20ème passage	IO^7 DL_{50}	IO^6 DL_{50}
50ème passage	IO^7 DL_{50}	IO^6 DL_{50}
75ème passage	IO^7 DL_{50}	IO^5 DL_{50}
IOOème passage	IO^7 DL_{50}	IO^3 DL_{50}
I30ème passage	IO^7 DL_{50}	IO DL_{50}
200ème passage	IO^7 DL_{50}	(I)

(I) 5 % des bovins présentent des lésions fugaces localisées au point d'inoculation.

On peut comparer les résultats obtenus sur vache à la virulence du muscle de lapin pour le souriceau (Tableau 7, courbe 3). La diminution du pouvoir infectieux pour le boeuf pouvait être due à une raréfaction progressive du virus ; c'est vraisemblablement ce qui se passe au cours des 5 premiers passages sur lapereau, ce n'est plus vrai à partir du 25ème passage, puisque le titrage sur souriceau nouveau-né indique que le muscle de lapin contient de 10^6 à 10^7 doses léthales souriceau par gramme de tissu. Entre le 75ème et le 130ème passage sur lapin le pouvoir pathogène pour le boeuf diminue rapidement ; c'est au cours de ces passages que l'on a pu, de manière régulière, réaliser l'infection du lapin adulte.

Cette transformation qualitative du virus aphteux est encore perceptible à la lumière d'un certain nombre de faits :

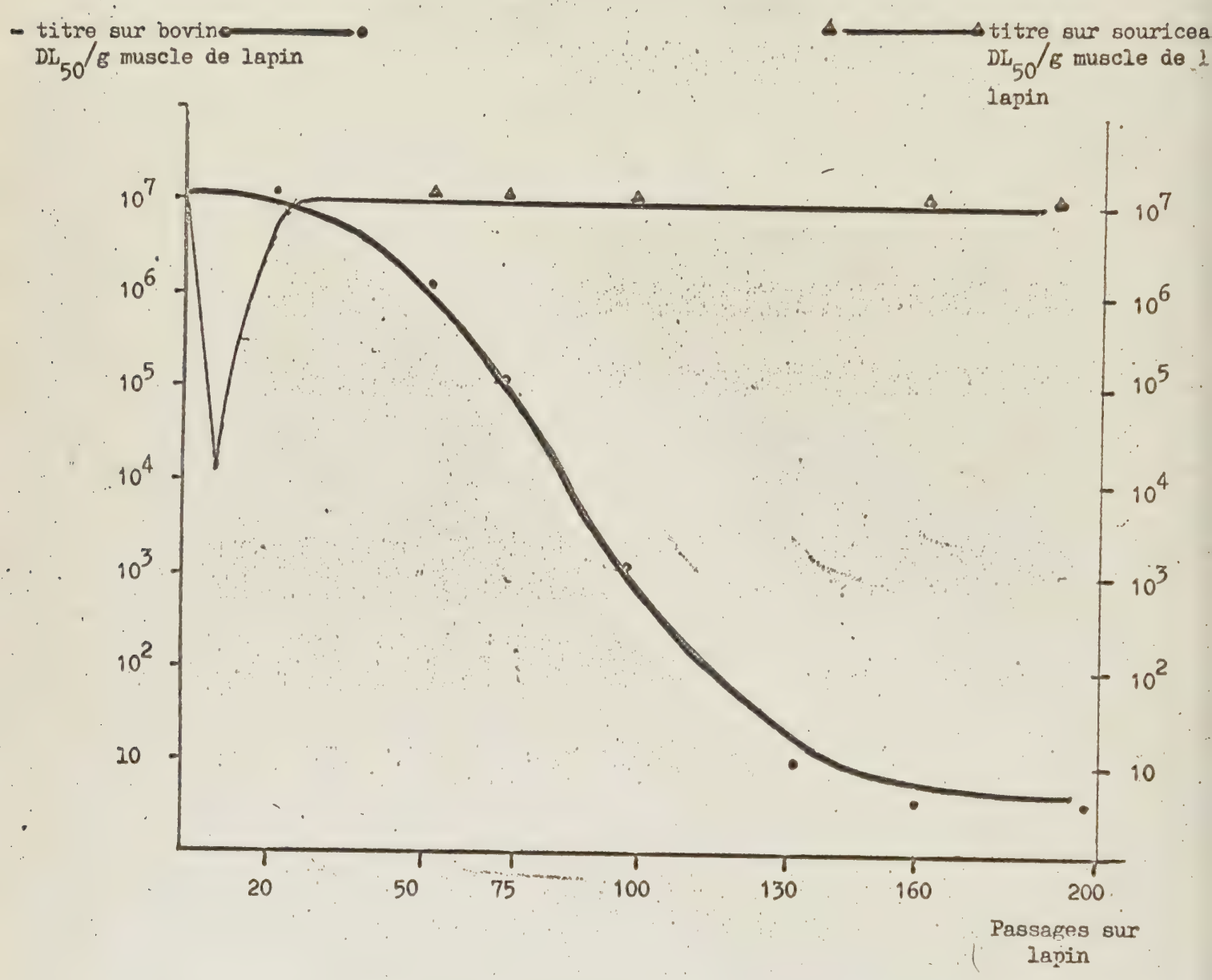
- les lésions primaires apparaissent plus tardivement et de façon moins constante au fur et à mesure que le nombre de passages sur lapin augmente : à partir du 50ème passage la lésion apparaît au point d'inoculation en 36 heures au lieu de 18 heures.
- certains bovins ne réagissent plus à l'inoculation du virus même concentré.
- les lésions ne sont plus du type vésiculaire, mais plutôt des érosions du derme.
- les aphtes disparaissent parfois en 24 heures.

Cette irrégularité rend difficile l'interprétation quantitative des résultats des titrages des virus lapinisés ; tout ce que l'on peut indiquer c'est une évolution du pouvoir pathogène dans le sens de la diminution de la gravité des lésions.

Le titre du virus pour le boeuf varie selon l'âge du lapin d'où proviennent les muscles : au 80ème passage nous avons comparé l'infectiosité pour le bovin de muscles de lapins infectés à

COURBE 3

Evolution du titre du virus aphteux au cours des passages sur lapin



Le "virus lapin" a été titré au cours des passages sur bovin par voie intradermolinguale e sur souriceau.

La diminution du titre sur souriceau entre le premier et le cinquième passage sur lapereau marque la période d'adaptation du virus. Nous n'avons pas effectué de titrage sur bovin à ce moment là.

l'âge de 20 jours, de 60 jours, de 90 jours. Tous ces muscles contiennent IO^7 DL_{50} souriceau par gramme (cf/ Tableau 8).

TABLEAU N° 8

Virus : 80ème passage sur lapin
Infectiosité pour le boeuf selon l'âge du lapin
de un gramme de muscle de lapin infecté

Age du lapin	DL_{50} souriceau	DL_{50} bovin
20 jours	IO^7 DL_{50}	IO^3
60 jours	IO^7 DL_{50}	IO^2
90 jours	IO^7 DL_{50}	IO

On voit que les muscles des lapins non sevrés contiennent un virus encore pathogène pour le boeuf et que les muscles des lapins de 60 et 90 jours sont beaucoup moins virulents.

En même temps le virus semble perdre progressivement son pouvoir de généralisation chez la vache : sur 20 vaches utilisées pour les virus ayant subi de 75 à II5 passages sur lapin, 8 n'ont présenté aucune lésion podale lors de l'examen pratiqué 5 à 7 jours après l'inoculation. Ce délai est largement suffisant pour permettre la manifestation des lésions de généralisation lorsqu'il s'agit du virus aphteux sauvage. Ces faits soulignent la pression de sélection exercée sur le virus aphteux par l'organisme du lapin, en fonction de l'âge de l'hote.

- Pouvoir pathogène du virus aphteux "lapinisé" inoculé par voie intramusculaire, sous-cutanée, ou intraveineuse chez les bovins

Les voies sous-cutanées et intraveineuses ont été très peu utilisées au cours de nos expériences : la voie sous-cutanée ne permet que de façon irrégulière la multiplication du virus dans l'organisme bovin et l'infection par la voie intraveineuse ne provoque que rarement une réponse.

L'observation de lésions musculaires chez le lapin nous a conduit à injecter le virus par voie intramusculaire chez le boeuf : ce choix s'est avéré heureux puisque nous avons pu contrôler que le virus ainsi introduit dans l'organisme bovin s'y multipliait intensément et de façon régulière. La multiplication du virus lapinisé dans les muscles des bovins a été étudiée en suivant la virémie qui se manifeste simultanément ; nous décrirons comment évoluent les lésions buccales, musculaires et cardiaques chez le boeuf et nous montrerons que le virus lapinisé perd son pouvoir de diffusion d'animal à animal. (Les signes cliniques et les lésions) La multiplication du virus modifié ne s'accompagne dans la plupart des cas d'aucun signe clinique ni d'aucune hyperthermie. On observe cependant, chez moins de 10% des animaux inoculés, l'apparition de petites lésions aphteuses au niveau de la cavité buccale et des espaces interdigités dans les 10 jours qui suivent l'administration du virus. Les lésions dûes au virus lapinisé ont un aspect et une localisation très particuliers. De petits aphtes, sans tendance à la confluence, se manifestent sur les faces latérales de la langue, là où frottent les molaires ; on peut aussi trouver quelques excoriations en arrière des incisives sur la machoire inférieure ; ce sont parfois les papilles de la pointe de la langue qui brunissent et qui sont érodées. Ces lésions n'empêchent pas l'animal de manger, il n'y a pas émission de salive ; elles disparaissent sans laisser de trace en 4 ou 5 jours.

Chez des veaux inoculés à l'âge de 4 mois nous avons observé des lésions de dégénérescence musculaire.

Ces phénomènes qui accompagnent la multiplication du virus aphteux lapinisé chez le boeuf peuvent parfois prendre un aspect dramatique : II8 bovins ont été inoculés à l'aide d'une préparation de virus lyophilisé ; 5 animaux meurent dans la semaine qui suit : il s'agit de bêtes jeunes (moins de 2 ans) qui présentent pendant quelques heures des troubles de l'équilibre puis tombent et meurent en quelques minutes en montrant des signes d'asphyxie. A l'autopsie on trouve des lésions du myocarde caractérisées par des pétéchies et des suffusions sanguines le long des sillons interventriculaires ; à la coupe le muscle cardiaque semble friable et décoloré. Nous avons recherché le virus dans les différents muscles de ces bovins ; le plus souvent on ne trouve pas de virus dans le myocarde mais le titre du virus dans les masseters et les muscles de l'encolure voisins du point d'inoculation peut atteindre IO^2 ou IO^3 DL_{50} souriceau par gramme de tissu (I34).
Prunet a réalisé des électrocardiogrammes à la suite de l'inoculation du virus lapinisé à des bovins et a mis en évidence un certain nombre d'anomalies : tachycardie, augmentation du rapport T/ Q R S, extrasystoles (I53).

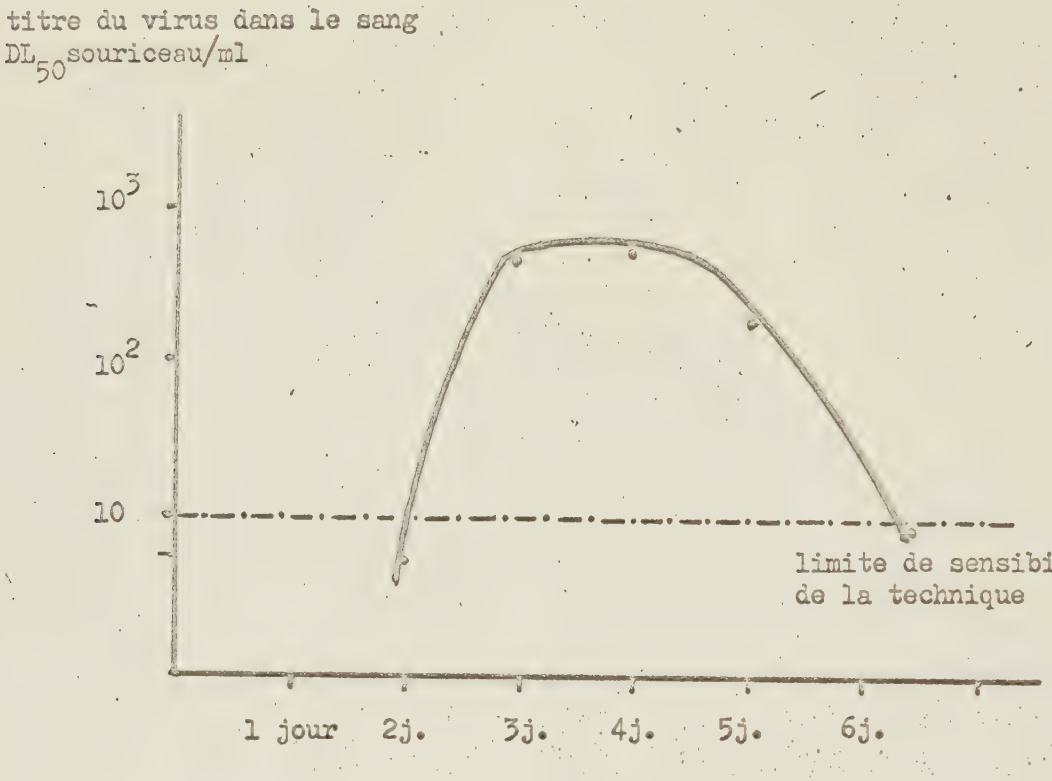
De l'ensemble de ces faits on peut conclure que si la multiplication du virus lapinisé dans les muscles des bovins reste la plupart du temps sans conséquence clinique l'on peut observer des lésions chez certains animaux et une affinité particulière du virus pour le myocarde chez les jeunes bovins. Nous discutons plus loin du rôle du clonage dans l'obtention de mutants totalement non pathogènes : disons dès à présent que certains mutants de la population ont tendance à être très pathogènes en se multipliant dans le myocarde.

- La Virémie

L'injection de IO^5 à IO^6 DL_{50} souriceau de virus lapinisé dans les muscles de l'encolure des bovins fait apparaître une virémie qui persiste 2 à 4 jours et témoigne de la multiplication du virus (IO).

COURBE 4

La virémie, au cours de la multiplication du virus aphteux lapinisé chez le boeuf



Les bovins sont saignés chaque jour après l'inoculation du virus et l'on recherche l
titre du virus en injectant diverses dilutions de sang au souriceau de quatre jours.

On retrouve du virus aphteux dans le sang des animaux 2 à 3 jours après l'inoculation de virus : le titre est en moyenne un peu supérieur à 10^2 DL_{50} souriceau par millitre de sang. Si l'on fait des prélèvements de sang quotidiens pendant les 10 jours qui suivent l'infection on peut mettre en évidence la virémie chez 75 % des animaux. Ce travail a été reproduit sur plusieurs centaines de bovins mais il faut souligner que les prélèvements étant réalisés de 24 heures en 24 heures, une virémie fugace passe inaperçue (courbe 4).

- Le pouvoir de diffusion du virus :

La contagiosité du virus s'estompe quand le nombre de passages sur lapin augmente. Du virus lapinisé au stade du 50ème passage est capable de provoquer des lésions spécifiques au niveau de la langue des bovins infectés expérimentalement qui sont contagieux pour leurs voisins : en quelques jours on trouve des aphtes au niveau de la langue et des lèvres des bovins témoins non inoculés qui présentent tous les symptômes de la maladie naturelle. Par contre des bovins inoculés avec du virus du 130ème passage ont été mis en cohabitation permanente avec des animaux normaux ne présentant aucun anticorps sérique ; bien que certains des bovins qui ont reçu le virus lapinisé aient présenté des petits aphtes dans la bouche et dans les espaces interdigités, les animaux témoins n'ont présenté aucune lésion aphteuse pendant les 15 jours de contact ; leur sérum prélevé 3 semaines après l'expérience est toujours dépourvu d'anticorps spécifiques et leur sensibilité à l'épreuve de virulence reste totale.

5 - Le pouvoir pathogène du virus lapinisé pour le porc.

Les porcs pesant de 25 à 35 Kgs sont inoculés par voie intra-dermique au niveau de la couronne et sur la face postérieure du pied en arrière de l'onglon car ces points sont ceux qui sont les plus favorables à l'apparition éventuelle des lésions après inoculation expérimentale. Le virus utilisé a subi 130 passages sur lapin. Les animaux ayant reçu 0,6 ml de virus titrant

10^5 DL_{50} souriceau répartis en 6 points présentent dans les 4 ou 5 jours qui suivent des aphtes aux points d'inoculation. On observe ensuite l'établissement de lésions secondaires au niveau des membres postérieurs (couronne, espaces interdigités) et du groin et le 10ème jour les lésions se cicatrisent et tendent à disparaître.
Dans certains cas les porcs présentent des signes cliniques généraux, des paralysies à partir du 3ème jour qui suit l'inoculation du virus, et ils meurent rapidement surtout s'ils sont soumis à un exercice musculaire violent. A l'autopsie on note des foyers de nécrose du muscle cardiaque et des lésions très étendues de dégénérescence des fibres musculaires exactement comme chez le lapin. Prunet a observé des signes à l'électrocardiagramme chez des animaux apparemment résistants au virus (153)
Le virus aphteux lapinisé est donc très pathogène pour le porc : non seulement il provoque des aphtes au point d'inoculation mais encore il se multiplie intensément dans les muscles et parfois même dans le muscle cardiaque en provoquant des lésions de dégénérescence qui peuvent amener la mort de l'animal.

Nous voyons donc qu'au cours des passages sur lapin adulte le pouvoir pathogène du virus aphteux vis-à-vis des différentes espèces animales spontanément ou expérimentalement sensibles se modifie. On peut suivre cette évolution des propriétés du virus en mesurant, vis-à-vis de chacune des espèces, le nombre de doses infectieuses contenues dans un gramme de tissu infecté soit avec du virus sauvage, soit avec du virus lapinisé (tableau n° 9).

TABLEAU N° 9

Pouvoir pathogène vis-à-vis de différentes espèces animales

Espèces	Virus sauvage Nombre de DL_{50}/g épithélium lingual bovin	Virus lapinisé O.L.I30 (I30ème passage) Nombre de DL_{50}/g muscle de lapin
Cobaye	$I0^7$	$I0^2$
Souriceau	$I0^6$	$I0^7$
Souris adulte Balb	I0	$I0^6$
" C_3 H	I0	$I0^2$
Lapin adulte	0	$I0^2$
Boeuf	$I0^7$	I0
Porc	$I0^6$	$I0^3$

Pour les espèces animales où l'infection par le virus aphteux se manifeste en provoquant des aphtes (boeuf, porc, cobaye) l'adaptation du virus au lapin adulte amène une diminution du pouvoir pathogène. Pour les espèces où l'infection par le virus aphteux est liée à une multiplication du virus dans tout l'organisme (souriceau, souris adulte) l'adaptation du virus au lapin adulte correspond à une augmentation du pouvoir pathogène.

Il apparaît donc que les passages sur lapin adulte tendent à sélectionner les particules de virus aphteux ayant un pouvoir intense de multiplication dans les muscles et ayant une faible capacité à se développer dans le derme ou les muqueuses.

b) Les propriétés antigéniques du virus aphteux lapinisé :

Trois techniques permettent de reconnaître les propriétés antigéniques du virus : identifier le virus contenu dans les muscles du lapin à l'aide d'un sérum étalon ; démontrer la présence d'anticorps spécifiques chez les animaux qui ont reçu le virus lapinisé ; enfin éprouver l'immunité des bovins 2I jours après leur avoir injecté le virus lapinisé.(I34, I38, 204).

I - Propriétés antigéniques révélées par un sérum étalon homologue.

Le virus aphteux présent dans les muscles de lapin est décelable par la technique de fixation du complément utilisée par Ubertini (I92) et Camand (56). La sensibilité de la réaction est plus grande lorsque le virus est obtenu à partir de muscles de lapin âgé de 35 à 70 jours que lorsqu'il provient de muscles de lapereau et cela indépendamment du nombre de passages subis. Pour que le muscle infecté puisse fixer le complément en présence des anticorps spécifiques il doit contenir une quantité assez importante de virus : 10^6 à 10^7 DL_{50} souriceau par gramme de tissu.
D'autre part le pouvoir infectieux du virus aphteux de type O contenu dans les muscles de lapin est neutralisé de façon spécifique par le sérum de cobaye hyperimmunisé contre le virus sauvage de type correspondant. Le sérum de cobaye dilué au I/50 neutralise en 30 minutes à 37° le pouvoir infectieux pour le lapin de 10^6 DL_{50} souriceau de virus lapinisé.

2 - Propriétés antigéniques révélées par la présence d'anticorps spécifiques chez des animaux inoculés avec du virus lapinisé.

La fixation du complément est effectuée en utilisant comme antigène du virus aphteux contenu dans l'épithélium lingual du bovin et comme anticorps le sérum des animaux (lapin, cobaye, boeuf) récolté I5 à 30 jours après l'administration du virus lapinisé.

Les mêmes sérums sont capables de neutraliser de 100 à 10000 doses infectieuses de virus lapinisé ou de virus bovin homologue (204).

Chez les souris adultes, les mères qui dévorent les cadavres des jeunes infectés par le virus lapinisé s'immunisent et présentent des anticorps sériques neutralisants dans les semaines qui suivent l'ingestion du virus. Leur colostrum transmet des anticorps aux jeunes de la portée suivante leur conférant une immunité spécifique du type de virus. La transmission utérine des anticorps n'a pas été retrouvée : si l'on empêche les souriceaux de consommer le colostrum contenant les anticorps leur sensibilité au virus reste entière (149).

3 - Propriétés antigéniques révélées par la résistance à l'infection expérimentale des bovins vaccinés.

La technique consiste à éprouver à l'aide de 10000 doses de virus homologue pleinement virulent les bovins qui ont reçu le vaccin depuis 3 semaines. On juge de l'efficacité du vaccin en comparant la généralisation de l'infection d'épreuve chez les vaccinés et chez les témoins neufs (101) ; un bon vaccin empêche l'apparition des lésions secondaires au niveau des espaces interdigités et peut même inhiber la confluence des lésions primaires linguales.

Environ 200 bovins ont été vaccinés à l'aide du virus lapinisé puis éprouvés par le virus sauvage correspondant. Il n'existe pas de corrélation entre la quantité de virus vaccinal inoculé et l'apparition de l'immunité : l'inoculation de 10^6 ou 10^7 DL_{50} par animal n'augmente pas la proportion des vaches résistantes à l'inoculation d'épreuve. Il faut noter que les animaux présentant des lésions post vaccinales sont en même nombre (5% du lot inoculé) que l'injection comporte 10^5 ou 10^7 DL_{50}. Cependant au dessous d'un certain seuil la quantité de virus "vaccinal" intervient dans une certaine mesure : l'injection

aux bovins de 10^5 DL_{50} souriceau de virus lapinisé fait apparaître l'immunité chez 90% d'entre eux ; si on utilise moins de 10^4 DL_{50} par bovin le pourcentage des animaux immunisés baisse rapidement.

Le virus lapinisé est doué d'un meilleur pouvoir antigène que le virus adapté au cobaye ou que le virus d'origine bovine. Cette propriété est peut être dûe au fait que le virus lapinisé est peu pathogène pour le boeuf et que l'animal conserve une capacité de réponse immunitaire intacte alors que les virus qui provoquent une maladie grave affaiblissent les mécanismes de défense de l'organisme.

C O N C L U S I O N

Après 130 passages chez le lapin (virus O.L.130) le virus aphteux a conservé des caractères antigéniques identiques à ceux du virus original. Sa multiplication chez le bovin, attestée par le contrôle de la virémie, s'accompagne de l'établissement d'une immunité qui ressemble beaucoup à celle qui suit la maladie (intensité, persistance, précocité, spécificité).

Si l'on poursuit les passages sur lapin adulte le virus perd son pouvoir de multiplication chez le boeuf : l'on ne peut plus mettre la virémie en évidence et très peu d'animaux présentent des anticorps circulants ; l'épreuve à l'aide de virus sauvage montre que l'immunité obtenue se rencontre seulement chez un petit nombre d'animaux.

Les passages en série du virus aphteux sur lapereau puis sur lapin adulte ont facilité l'apparition de virus ayant des propriétés différentes du virus original : vis-à-vis des espèces spontanément sensibles au virus aphteux le changement principal

est une augmentation du pouvoir du virus à se multiplier dans les muscles et une diminution de la capacité de multiplication au niveau des tissus normalement sensibles (muqueuses buccale et digestive, espaces interdigités).

Le pouvoir pathogène pour la souris adulte peut servir à caractériser les virus lapinisés : c'est un caractère marqueur qui reste stable après la multiplication du virus chez le boeuf et chez le porc.

Le développement du virus est suivi de l'apparition d'anticorps spécifiques du type de virus : la structure antigénique n'est donc pas modifiée de manière décelable au cours de la sélection des virus les plus aptes à se propager dans les muscles du lapin adulte.

C H A P I T R E I V

SELECTION DE MUTANTS A PARTIR DU VIRUS APHTEUX LAPINISE PAR PASSAGES EN SERIE EN CULTURE CELLULAIRE

I - TECHNIQUE DE SELECTION

A - Les cellules et les milieux de culture

Nous avons employé des cellules de première explantation provenant d'animaux naturellement ou expérimentalement sensibles au virus aphteux : cellules de type fibroblastique provenant de rein de lapin nouveau-né ; de foetus de souriceau et d'embryon de poulet ; cellules de type épithélial issues du rein de cobaye, de veau, de boeuf et de porc.

Mais les cultures de première explantation nécessitent la manipulation d'animaux et peuvent être des sources directes ou indirectes de contamination : c'est pourquoi, après avoir noté que des cellules de souche permettaient d'obtenir des résultats identiques à ceux observés avec les cellules de première explantation, nous avons abandonné ces dernières au bénéfice de deux lignées :

a) La souche de cellules obtenue par Haag (96) à partir de rein de porc a été utilisée entre le 30ème et le 80ème passage. Ces cellules de type épithélial ont un nombre de chromosomes pratiquement identique à celui des cellules de rein de porc de première explantation ; ces cultures sont faciles à obtenir et les tapis cellulaires sont très homogènes : elles sont utilisées pour les passages du virus et pour l'isolement des clones.

b) La lignée cellulaire de rein de jeune hamster (BHK 2I, clone I3 de Stocker et Mc Pherson) (I77) a un pouvoir de multiplication intense ; les cultures obtenues sont de type fibroblastique et sont employées pour l'étude du virus en cycle unique.

Les milieux de culture :

Les cellules de rein de porc sont cultivées en milieu de Earle additionné de lactalbumine avec une faible quantité de bicarbonate (2 g/litre), d'extrait de levure (Difco I g/litre) et IO% de sérum de veau.

Les cellules de hamster sont cultivées dans le milieu de Eagle deux fois concentré en vitamines et en acides aminés préconisé par le Laboratoire de Virologie de Glasgow.

B - Le développement du virus lapinisé en culture cellulaire

Les cultures sont inoculées avec du sang de souriceau infecté à l'aide du virus lapinisé. Les passages sont réalisés à l'aide du milieu de culture où le virus s'est multiplié (3, 6, 8).

a) Développement du virus dans les conditions de culture à 37°

Dans les cellules de rein de lapin, de foetus de souris, d'embryon de poulet, le virus se multiplie intensément sans provoquer d'altération cellulaire perceptible. Le tapis cellulaire reste en bon état et le métabolisme demeure normal dans les jours qui suivent l'infection. La quantité maximum de virus est obtenue en 48 heures ; si l'on renouvelle régulièrement le milieu de culture, on observe une production de virus qui diminue pendant une dizaine de jours sans que l'on ait jamais d'altération cellulaire autre que le vieillissement normal.

Dans les cellules de rein de cobaye, de veau, de boeuf, de porc et dans les cellules établies le virus aphteux se multiplie et suscite l'apparition d'un effet cytopathogène caractéristique des virus du groupe Picorna (2I, I65). Après un

délai qui dépend de la multiplicité de l'infection et de l'adaptation du virus aux cellules, on observe des foyers de cellules arrondies qui se détachent de la paroi du flacon ; la dégénérescence cellulaire s'étend peu à peu à l'ensemble de la culture. Dans les conditions habituelles de passage du virus, la multiplicité de l'infection étant de I pour I000 cellules, les lésions cellulaires apparaissent en 24 heures ; le titre de virus obtenu est de IO^6 DCP_{50} par ml de milieu de culture.

TABLEAU N° IO

Multiplication du virus aphteux lapinisé sur diverses cellules

Cellules	Pouvoir cytopathogène à 37°	Titre du virus obtenu
Rein de lapin âgé de I j.	0	IO^7 DCP_{50} (I)
Foetus de souris	0	IO^5 DCP_{50} (I)
Embryon de poulet	0	IO^5 DCP_{50} (I)
Rein de cobaye	+	IO^6 DCP_{50}
Rein de veau	+	IO^6 DCP_{50}
Rein de boeuf	+	IO^6 DCP_{50}
Rein de porc	+	IO^6 DCP_{50}
Souche établie de rein de porc	+	$IO^{6,5}$ DCP_{50}
lignée cellulaire BHK	+	IO^6 DCP_{50}

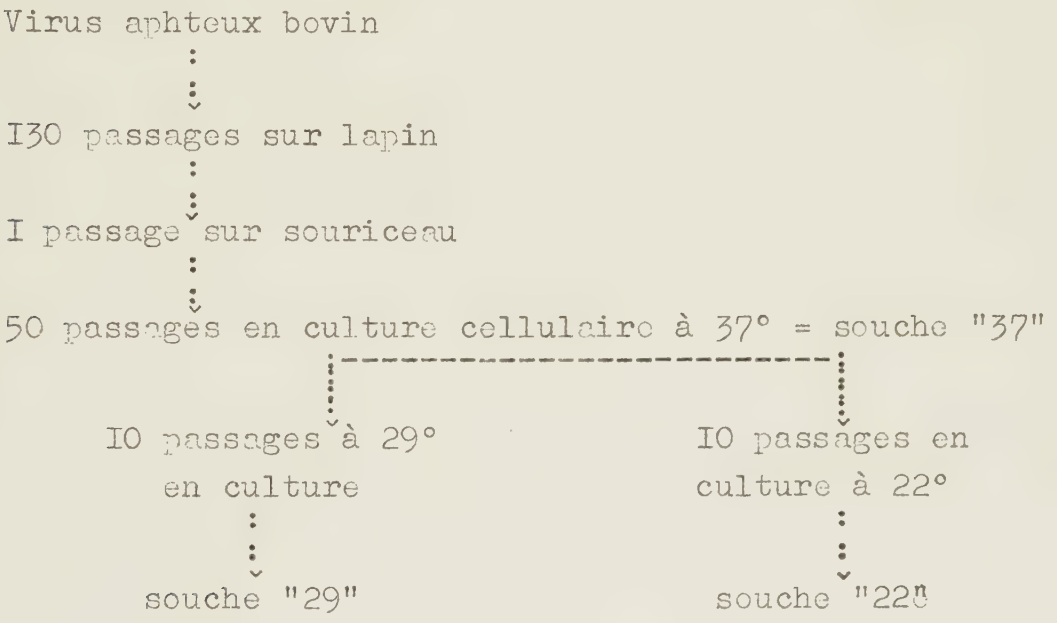
(I) Dans ces trois cas les cultures sont titrées secondairement sur cellules de rein de porc.

On voit qu'il n'y a pas de rapport entre la manifestation de l'effet cytopathogène et le titre de virus obtenu.

b) Développement du virus lapinisé à des températures différentes de 37°

Le virus aphteux de type O adapté au lapin a été passé en série (50 fois) à 37° sur des cultures de rein de lapin et de rein de porc. A partir de cette souche "37" nous avons effectué des passages sur des cellules de rein de porc incubées soit à 29° soit à 22° : nous avons ainsi préparé une souche "29" et une souche "22" qui ont subi dix passages à ces températures, ainsi qu'il est décrit ci-dessous

Schéma de la préparation des souches de virus "37", "29", "22"



Toutes les cultures reçoivent un inoculum de virus correspondant à I DCP_{50} pour I000 cellules. Nous avons ménagé une absorption à 37° pendant une heure avant d'incuber les cellules infectées à 29°, à 22°, à 40°.

A 29° l'effet cytopathogène du virus se manifeste en 48 ou 72 heures. La multiplication du virus est plus lente qu'à 37° ;

mais lorsque la plupart des cellules sont altérées et se détachent du verre, le titre du virus est le même.

A 22° le virus aphteux lapinisé se multiplie dans les cellules de rein de porc sans les détruire. Le titre obtenu en 96 heures est de 10^4 DCP 50/ml.(Il faut réaliser le titrage à 37°). La production de virus se maintient pendant 3 jours puis diminue progressivement : les passages en série à 22° ne provoquent ni augmentation ni accélération de la production de virus.

A 40° le virus ne se multiplie pas et les cultures restent intactes.

Les résultats ainsi obtenus sont schématisés dans le tableau n° II.

TABLEAU N° II

Culture du virus lapinisé en cellules établies de rein de porc.

Température d'incubation	Délai	Pouvoir cytopathogène	Titre de virus (DCP_{50}/ml)
37°	24 h	+	$10^{6,5}$
40°	24 h à 96 h	0	0
29°	48 h	+	10^6
22°	96 h	0	10^4

II - LES PROPRIETES DU VIRUS OBTENU EN CULTURE CELLULAIRE

A - Le pouvoir pathogène

Nous avons comparé le comportement de la souche "37", de la souche "29" et de la souche "22" vis-à-vis des animaux expérimentalement et naturellement sensibles au virus aphteux.

a) Pouvoir pathogène pour le souriceau :

Les souriceaux de toutes origines âgés de 3 à 6 jours sont sensibles à l'infection par les virus cultivés in vitro. Le titre du virus est plus faible sur les souriceaux que sur les cellules de rein de porc ; il faut IO^2 DCP_{50} de la souche "37", et IO^3 DCP_{50} de la souche "29" ou "22" pour tuer le souriceau en 48 heures.

b) Pouvoir pathogène pour la souris adulte :

De même que pour le virus lapinisé certaines souches de souris résistent aux virus de culture. Alors que les souris Swiss et C_3H ne répondent par aucun signe clinique, les souris C_{57} Black/6 et Balb/C présentent des paralysies et parfois meurent après l'inoculation intrapéritonéale de IO^4 DCP_{50} de virus.

Etant donné qu'on ne peut pas obtenir in vitro avec la souche "22" un titre supérieur à IO^4 DCP_{50}/ml, nous avons adopté celui-ci pour étudier les 3 souches chez la souris.

La souche "37" à la dose de IO^4 DCP_{50} tue 50% des souris adultes C_{57} Black/6 ou Balb/C ; certains animaux présentent entre la 24ème et la 48 ème heure une virémie qui n'est accompagnée d'aucun signe clinique ; d'autres animaux semblent complétement résistants à l'infection et ne synthétisent même pas d'anticorps à la suite de l'inoculation du virus.

La souche "29" tue 20% des souris C_{57} Black/6 ou Balb/C inoculées ; la virémie est tardive et n'existe pratiquement que chez les animaux qui mourront.

La souche "22" tue moins de 10% des souris Balb/C inoculées. Les souris adultes C_{57} Black/6 ne sont pas sensibles à ce virus.

c) Pouvoir pathogène pour le lapin :

Le virus "37" provoque une maladie clinique et des lésions musculaires chez le lapin de I Kg. Il faut 10^6 ou 10^7 DCP_{50} pour infecter 2 lapins sur 5.

La souche "29" et la souche "22" sont incapables de provoquer des symptômes ou des lésions chez le lapin adulte jeune. Elles tuent cependant à la dose de 10^3 DCP_{50} le lapereau âgé de moins de 8 jours.

d) Pouvoir pathogène pour le cobaye :

Aucun des virus de culture n'a de pouvoir pathogène pour le cobaye quelles que soient la dose et la voie d'incubation.

Nous avons résumé dans le tableau 12 les propriétés pathogènes des virus étudiés à l'égard des différentes espèces animales.

TABLEAU N° I2

Pouvoir pathogène des souches de virus à l'égard de différentes espèces animales

Virus aphteux	Boeuf	Porc	Cobaye	Lapin	Souris adultes			Souriceau
					C_3H	C57 Black/6	Balb/C	
virus sauvage	+	+	+	0	0	0	0	+
virus lapinisé	±(x)	+	+	+	+	+	+	+
Virus "37"	0	+	0	+	0	+	+	+ (xxx)
Virus "29"	0	0	0	0	0	±	+	+ (xxx)
Virus "22"	0	0	0	0	0	0	±(xx)	+ (xxx)

(x) ± : chez 20% des bovins inoculés par voie linguale avec du virus très concentré (IO^7 DCP_{50}) on observe de petites lésions sèches sans généralisation ultérieure.

(xx) ± : Les souris Balb/C reçoivent par voie intrapéritonéale IO^4 DCP_{50} de virus "22".

(xxx) : Il faut IO^2 DCP de la souche "37" et IO^3 DCP_{50} de la souche "29" ou "22" pour tuer le souriceau en 48 h.

---

e) Pouvoir pathogène pour le boeuf :

Ce travail porte sur une centaine d'animaux, soit environ 30 bovins pour chaque souche. Chacun des virus est inoculé à la dose de IO^5 DCP_{50}.

Le virus "37" n'a aucun pouvoir pathogène pour le boeuf quelles que soient la dose et la voie d'inoculation. Cependant il se

multiplie et l'on peut déceler une virémie chez 80% des animaux 4 jours après l'inoculation, le virus peut aussi être isolé des muscles à fonctionnement intense (masseters) si l'on sacrifie l'animal au moment de la virémie. On n'observe pas de lésion histologique. Toutefois chez le veau de 4 mois le virus "37" peut se montrer pathogène en provoquant des aphtes et, plus rarement, des lésions cardiaques entraînant la mort soudaine du jeune animal.

Le virus "29" n'a aucun pouvoir pathogène pour le boeuf et pour le veau. On peut mettre en évidence une virémie chez 50% des animaux 4 à 5 jours après l'injection du virus par voie musculaire.

Le virus "22" n'a aucun pouvoir pathogène mais il a perdu une bonne partie de son pouvoir de multiplication chez le boeuf : 20% à 30% des animaux présentent une virémie.

f) Pouvoir pathogène pour le porc :

Nous avons utilisé I50 porcins pesant de 20 à 30 Kgs. Le virus "37" possède un certain pouvoir pathogène pour le porc : lorsqu'on l'inocule à la dose de 10^4 DCP_{50} par voie intradermique il fait apparaître aux points d'inoculation des aphtes, et l'on peut observer dans les jours qui suivent une généralisation de l'infection au niveau du groin et des onglons.

Le virus cultivé à 29° ne fait apparaître des lésions primaires que dans un faible pourcentage de cas (5 à I0%) même si l'on injecte de grandes quantités de virus (10^6 DCP_{50}).

Le virus cultivé à 22° est totalement inoffensif pour le porc.

L'ensemble des résultats obtenus chez le boeuf et chez le porc est résumé dans le tableau I3 ci-dessous.

TABLEAU N° I3

Multiplication et pouvoir pathogène des différentes souches de virus chez le boeuf et chez le porc

Virus aphteux	BOEUF		PORC	
	pouvoir de multiplication	pouvoir pathogène	pouvoir de multiplication	pouvoir pathogène
Virus sauvage	+	+	+	+
Virus lapinisé	+	±	+	+
Virus 37°	+	0	+	+
Virus 29°	+	0	+	0
Virus 22°	±	0	±	0

B - Le pouvoir immunigène

L'immunité a été évaluée chez le boeuf par séroneutralisation et par injection de virus pleinement pathogène 3 semaines après l'inoculation de la souche vaccinale. Chez le porc, seule la séroneutralisation a été mise en oeuvre I5 jours après la vaccination (I35).

a) Chez le boeuf :

La souche "37" se multiplie régulièrement et la virémie est suivie de l'apparition d'anticorps neutralisants dont le titre augmente dans le sérum des bovins entre le 5ème et le I5ème jour après la vaccination. Les animaux qui ont des anticorps résistent à l'infection d'épreuve et l'immunité persiste au moins 6 mois chez 70 à 80% des animaux ; les animaux jeunes (I2 à I8 mois) sont plus facilement immunisés que les bovins âgés de 8 à II ans.

La souche "29" suscite une réponse irrégulière qui va de pair avec le fait que la virémie n'est observée que dans 60% des cas, ce qui montre bien l'importance de la multiplication du virus dans la protection conférée par les vaccins vivants.

La souche "22" ne confère aucune immunité aux animaux qui ne présentent pas de virémie ; les bovins chez qui le virus s'est multiplié sont résistants à l'infection expérimentale et ont un taux d'anticorps aussi élevé qu'avec les virus "29" ou "37".

b) Chez le porc :

La souche "37" provoque l'apparition d'anticorps neutralisant spécifiquement le virus aphteux de type O chez tous les animaux, même chez ceux qui n'ont pas présenté de lésion à la suite de l'inoculation du virus par voie intradermique.

La souche "29" suscite la synthèse d'anticorps dès le 5ème jour après l'inoculation du virus aussi bien chez les animaux qui ont des aphtes que chez ceux qui restent indemnes.

Le virus "22" est mauvais immunigène chez le porc.

C O N C L U S I O N

La culture du virus aphteux sélectionné à différentes températures met en évidence un certain nombre de faits :

- Le virus cultivé à 37° semble avoir conservé une partie des propriétés pathogènes du virus d'origine vis-à-vis des jeunes bovins et du porc ; il immunise les bovins et les porcins de manière très intense.

- Le virus cultivé à 29° est moins pathogène mais son comportement est irrégulier,

: tantôt il provoque de petites lésions et une bonne immunité,

: tantôt son pouvoir de multiplication persiste en l'absence de tout pouvoir pathogène, et l'on obtient alors une quantité importante d'anticorps neutralisants,

: tantôt il ne suscite ni lésion ni multiplication, ni immunité.

- Le virus cultivé à 22° n'est aphtogène ni pour le boeuf, ni pour le porc, mais c'est un mauvais immunigène car il ne se multiplie que pour un faible pourcentage d'animaux.

Les différences observées s'expliquent, nous allons le voir, par l'hétérogénéité des populations du virus qui constituent les 3 souches "37", "29", "22". Notre analyse a porté sur la souche "29".

C H A P I T R E V

LES CLONES PREPARES A PARTIR DU VIRUS PASSE SUR LAPIN PUIS EN CULTURE CELLULAIRE

Le comportement de la "souche 29" chez le porc et chez le boeuf évoque une hétérogénéité possible des virions qui entrent dans sa composition. On peut interpréter l'irrégularité des réponses observées comme les manifestations de divers états d'équilibre entre des virus aphtogènes et les virus totalement inoffensifs ; selon les conditions de la multiplication, la première catégorie est favorisée et suscite, comme si elle était seule, les phénomènes cliniques, alors que rien ne démontre la présence de l'autre catégorie. L'organisme du porc serait favorable à la révélation du pouvoir pathogène des virus qui chez le boeuf ne se distinguent pas des souches de virus non pathogènes.

Nous avons donc entrepris d'isoler des clones à partir de la souche de virus à diverses étapes de la sélection et nous avons comparé leurs propriétés in vivo et in vitro.

A - PREPARATION DES CLONES

Il est relativement facile d'isoler la plus petite quantité de virus capable de provoquer un effet cytopathogène et d'obtenir une souche de virus provenant de la multiplication d'une seule dose cytopathogène (DCP), mais on sait que chaque DCP correspond à un grand nombre de particules de virus : de 300 à 3000 selon les souches. Chercher à préparer une population homogène à partir d'un tel nombre de particules peut paraître aléatoire puisque, à l'heure actuelle, la notion de virion vérifiée pour les plages ne l'est pas pour les virus animaux ; cependant, en réalisant une série de dilutions à partir de la souche de virus cultivé à 29°, nous avons séparé des clones qui possédaient différentes propriétés physico-chimiques et biologiques . Nous avons adopté pour préparer les divers clones, la technique des dilutions limites :

chaque lot d'une série de dilutions logarithmiques du virus est distribué à raison d'un ml dans des tubes de culture cellulaire et incubé à 29° jusqu'à l'apparition du pouvoir cytopathogène. Le groupe dont la moitié des tubes présente un effet cytopathogène en 4 jours est considéré comme représentant la dilution limite du virus, c'est à dire que chaque tube du lot a reçu une DCP_{50}, ou même moins.

Ces clones de virus sont propagés à 29° et subissent deux isolements successifs selon la même technique ce qui nous a procuré une série de virus ayant pour origine un petit nombre de particules, ou une particule ; les clones obtenus sont homogènes et sont composés de virus ayant des propriétés identiques du moins en apparence.
La technique des plages nous a paru moins facile à utiliser pour cloner le virus aphteux non pathogène : outre les critiques que l'on oppose habituellement à la préparation des clones par l'isolement de plages, il faut noter que le virus ne provoque sous gélose que des plages de petit diamètre dont le dénombrement précis est délicat, et que les titres obtenus selon cette technique sont parfois inférieurs à ceux que l'on évalue en milieu liquide (24, 213).

Ayant préparé de cette façon, à partir de la souche de virus aphteux lapinisé passé en culture cellulaire à 37° puis à 29° (souche "29"), dix clones de virus, dans un second temps nous avons isolé les clones de virus directement à partir de la souche de virus aphteux lapinisé passé deux fois sur cellules de rein de porc à 29°. Puis nous avons comparé le comportement de ces virus, d'une part à celui de la souche de virus d'où les clones ont été isolés (soit la souche "29", soit la souche lapinisée) et d'autre part à celui de la souche sauvage obtenue par passage en culture du virus d'origine bovine.

B - ETUDE DES CLONES IN VITRO

En mettant à profit les propriétés générales du virus aphteux nous avons utilisé deux types d'épreuves : les premières se rapportent à la résistance de la capside du virus à divers agents dénaturants, les secondes consistent à déterminer le "rt" de chacun des clones étudié.

I - Examen de la résistance de la capside (5, 7, 93)

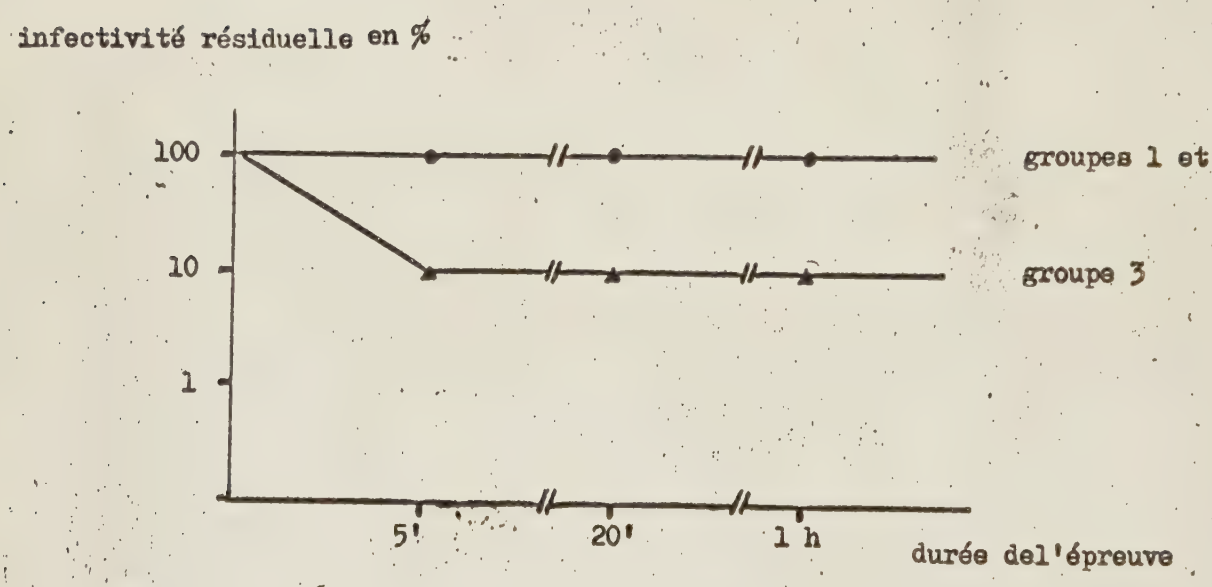
Le virus aphteux est facilement inactivé par les solutions acides : ce trait le distingue de la plupart des autres virus du groupe Picorna qui, eux, sont stables dans des solutions dont le pH est inférieur à 5 ; comme beaucoup de picorna virus, le virus aphteux est détruit par chauffage à 55°. De nombreux auteurs (Brown, Bachrach) ont montré que les solutions acides et la chaleur agissaient sur la capside et non sur l'acide nucléique du virus puisque l'on pouvait extraire des préparade virus aphteux inactivés par la chaleur ou les solutions acides, un acide nucléique parfaitement infectieux.

a) L'épreuve par solutions acides :

Selon Randrup (156) l'inactivation des virus par les solutions acides est dûe à la désintégration de la capside et à l'exposition de l'acide nucléique viral aux facteurs du milieu extérieur (la ribonucléase en particulier). Wittman (212), Mussgay (124), Bengtsson (26) ont plus particulièrement étudié l'action des solutions acides sur le virus aphteux et montré que les souches qui ont perdu leur pouvoir pathogène pour le boeuf sont souvent plus sensibles à cette action que les souches sauvages. La corrélation entre ces deux caractères n'est cependant pas vérifiée pour toutes les souches de virus.

FIGURE 5

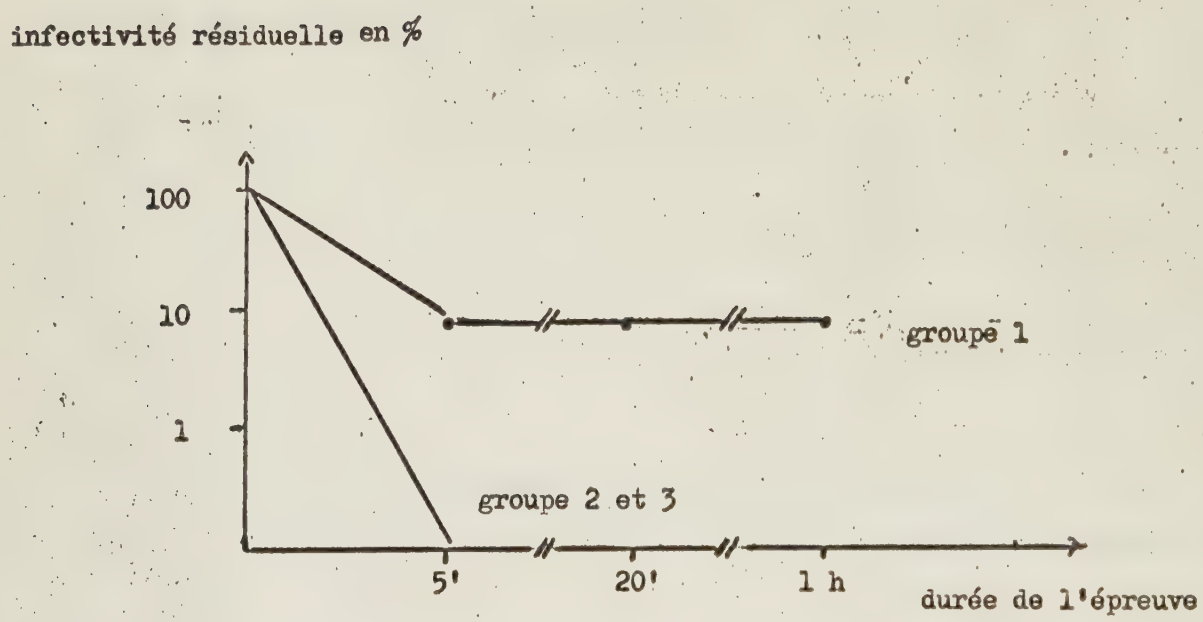
Inactivation des clones de virus aphteux à pH 6,8



A pH 6,8, les clones des groupes 1 et 2 sont stables tandis que les virus du groupe 3 subissent une inactivation partielle.

FIGURE 6

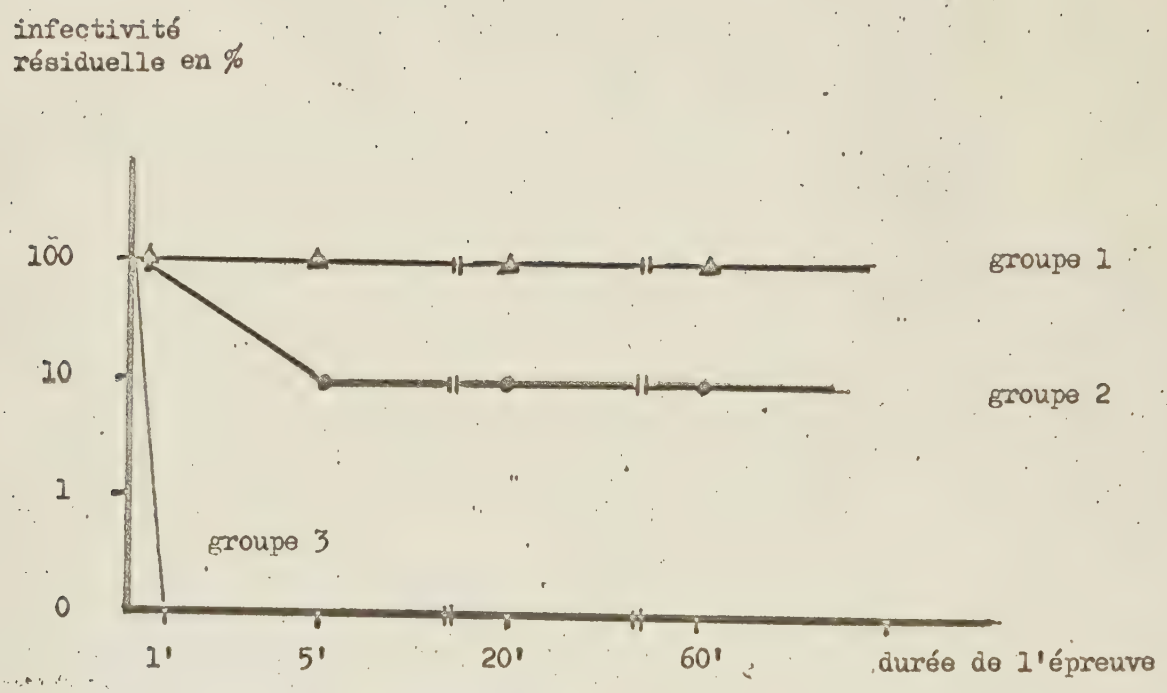
Inactivation des divers clones de virus aphteux à pH 6,2



A pH 6,2, les virus des groupes 1 sont partiellement inactivées, tandis que les virus des groupes 2 et 3 subissent une inactivation totale en moins de cinq minutes

FIGURE 7

Inactivation des divers clones à pH 6,4



A pH 6,4, les trois groupes de clones ont un comportement bien distinct : l'inactivation des virus du groupe trois est presque immédiate tandis que les virus du groupe deux subissent une inactivation partielle et que les virus du groupe un sont stables dans les limites de temps de l'expérience.

Nous avons établi une série de solutions de pH graduellement décroissant entre 7,6 et 6,2 par addition de phosphate acide de sodium 0,I M dans du milieu de Earle-lactalbumine contenant de l'extrait de levure et 2% de sérum de veau que nous utilisons comme milieu de maintien. Le virus est dilué dans le milieu de maintien avant d'être amené au pH choisi par introduction d'une quantité déterminée de la solution de phosphate de sodium. A la fin de l'épreuve le pH de la suspension de virus est ramené à 7,5 à l'aide d'une solution tamponnée 0,I M. Pendant toute la durée de l'expérience la température est maintenue à 30° par immersion dans un bain-marie.

L'inactivation du virus est mesurée en comparant les titres infectieux avant et après l'épreuve. Il nous est apparu qu'il n'était pas indispensable de tester les clones à tous les pH entre 7,6 et 6,2 car ceux voisins de 7 ne sont pas assez sélectifs à l'égard des différents clones (fig. 5). Après plusieurs expériences préliminaires nous avons simplifié l'épreuve en ne réalisant pour chaque clone que deux examens l'un à 6,2 l'autre à 6,4, la quantité de virus initialement placée dans chaque tube étant ajustée à 500 DCP/ml et la durée de l'expérience étant de 60 minutes en prélevant un échantillon dans chaque tube après I minute, 5 minutes, 20 minutes et I heure.

Destruction du virus à pH 6,2. Seule la souche sauvage résiste partiellement pendant 5 minutes : le titre infectieux du virus diminue de 90% (IO DCP/ml) et l'effet cytopathogène se manifeste tardivement par rapport au virus conservé en milieu neutre. La souche "29" et les clones qui en sont issus sont immédiatement et totalement inactivés dans ces conditions.(fig.6)

L'épreuve à pH 6,4 fait apparaître de grandes différences entre le virus sauvage et les divers clones isolés de la souche "29" ou directement de la souche lapinisée (fig. 7). Dans les limites de la durée de l'expérience la souche sauvage est stable alors que la souche "29" et la souche lapinisée subissent une

inactivation partielle (tableau I4). Les clones isolés à partir de ces souches se classent en deux groupes :

I) ceux qui présentent une inactivation limitée et se comportent comme les souches d'où ils ont été isolés
2) ceux qui perdent toute infectiosité

TABLEAU N° I4

Sensibilité aux solutions acides des souches et des différents clones de virus aphteux

	Sensibilité des souches de virus		
	Titre témoin (en DCP_{50}/ml) pH 7,6 - 60 mn	Titre après l'épreuve en DCP_{50}/ml pH 6,4 - 60 mn	pH 6,2 - 5 mn
O Sauvage	500	500	5
O Lapinisé	500	50	0
O "29"	500	50	0
	Sensibilité des clones de virus		
Groupe I	500	50	0
Groupe 2	500	0	0

8 clones sur IO isolés de la souche "29" sont totalement inactivés à pH 6,4
5 clones sur 20 isolés de la souche lapinisée appartiennent aussi à ce groupe.

On peut admettre que c'est à pH 6,4 que les différences entre les groupes de virus sont révélées avec la plus grande facilité. Nous avons utilisé de manière habituelle cette épreuve pour

classer les différents clones de virus en trois groupes :

- Les virus du groupe 0 qui sont stables : le virus sauvage.
- Les virus du groupe I qui subissent une inactivation partielle : la souche lapinisée, la souche "29" et certains clones qui en sont issus.
- Les virus du groupe 2 qui sont complétement inactivés : certains clones isolés soit à partir de la souche lapinisée, soit à partir de la souche "29".

Comme le virus lapinisé la souche "29" appartient au groupe I, le passage du virus en culture à 29° ne paraît pas modifier ses propriétés en milieu acide. Cependant la culture in vitro permet de sélectionner de plus en plus de clones très sensibles à pH 6,4 : alors que la plupart des clones issus de la souche lapinisée (I5/20) se trouvent dans le groupe des virus partiellement inactivés, les clones isolés de la souche "29" sont plûtot dans le groupe des virus totalement inactivés à pH 6,4 en I heure (8/I0)

b) Epreuve par la chaleur :

Pringle (I5I), Brown (53) montrent qu'à 55° la plupart des souches de virus aphteux perdent leur pouvoir infectieux. Bachrach (I5) a extrait l'acide nucléique du virus aphteux inactivé à 55°. La chaleur semble donc exercer son action en altérant la structure de la capside de manière telle que le virus perd son pouvoir infectieux. Wittman (2I2) et Bengtsson (26) ont montré que les souches de virus aphteux non pathogènes étaient souvent plus fragiles que les souches pleinement pathogènes.
L'épreuve par la chaleur est également employée pour les virus Picorna (208) et pour le virus Sindbis (55). Melnick protège de l'action de la chaleur certains virus du groupe Picorna en les mettant en suspension dans une solution molaire de chlorure de magnésium.

Nous avons étudié le comportement des souches de virus et des différents clones en plongeant les tubes contenant le virus dans des bains-marie dont la température est réglée, au I/IO de degré près, à 50, 55 et 60°. Pour rendre plus homogènes les conditions des expériences successives, et pour tenir compte de l'action possible, au cours du chauffage, des sels et du sérum contenus dans le milieu, chacun des virus a été dilué dans de l'eau distillée avant d'être éprouvé (5, 93). Nous avons cherché à mettre en évidence l'action stabilisatrice des ions Mg++ en diluant le virus dans une solution molaire de chlorure de magnésium avant de le chauffer.

Dans tous les cas le pH de la suspension est ajusté à 7,5. Après un certain nombre d'expériences préalables la durée de l'épreuve a été fixée à I5 minutes. La résistance à la chaleur s'exprime en comparant le titre infectieux du virus chauffé à celui de la suspension initiale du même virus. La dilution des virus est telle que la suspension témoin contienne 500 DCP_{50} / ml (tableau I5).

TABLEAU N° I5

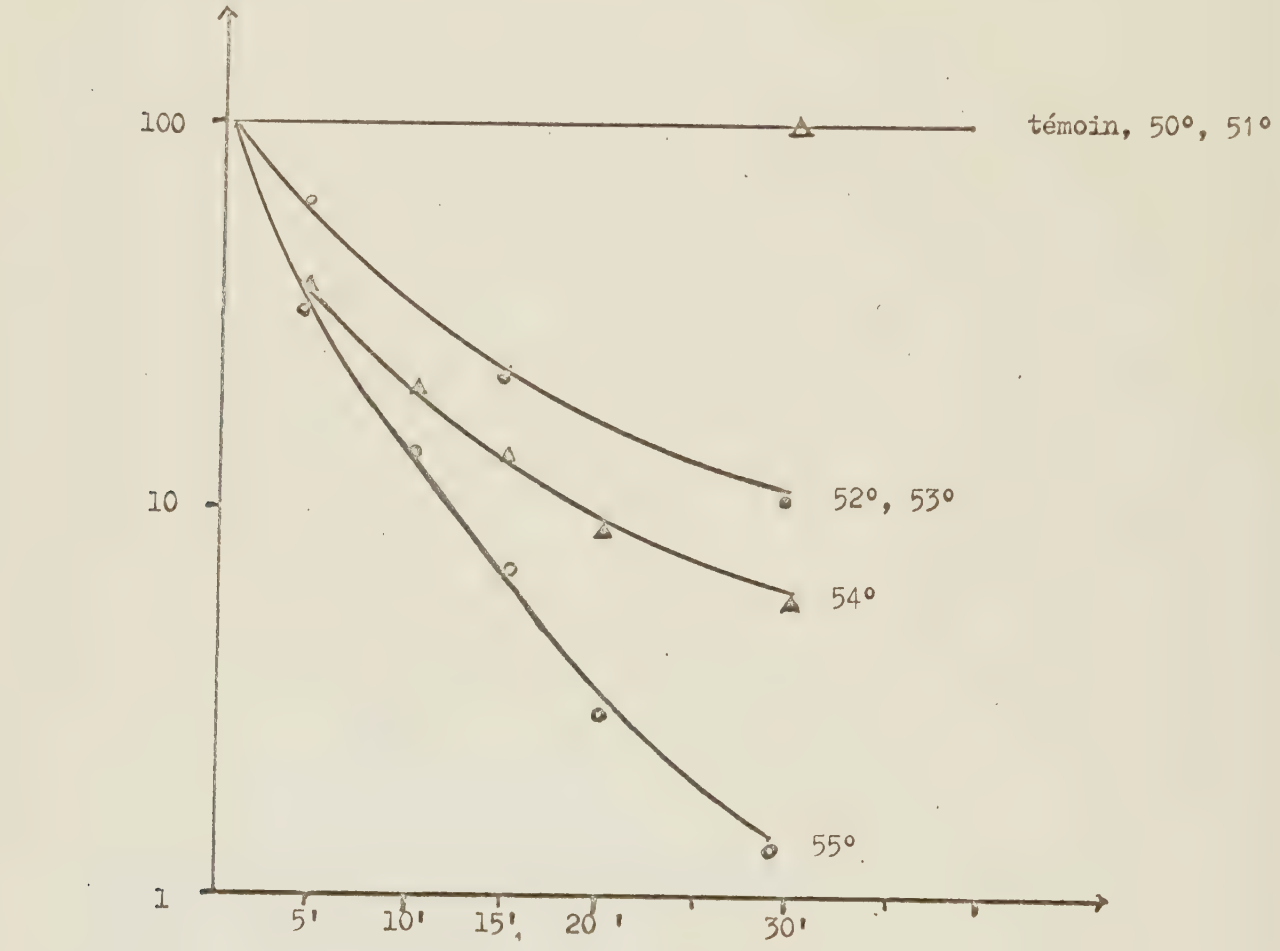
Résistance à l'action inactivante de la chaleur des différentes souches et des différents clones

	Titre du témoin DCP_{50}/ml	Pouvoir infectieux résiduel DCP_{50}/ml après I5' d'épreuve		
		50°	55°	60°
Virus sauvage	500	500	500	50
Souche O lapinisée	500	500	50	0
Souche "29"	500	500	50	0
- Résistance à la chaleur des clones de virus				
Groupe I	500	500	50	0
Groupe 2	500	50	0	0

FIGURE 8

Inactivation par la chaleur d'un virus du groupe 2

clone 16 isolé directement de la souche lapinisée



Le virus dilué dans l'eau distillée à raison de 500 DCP_{50}/ml a été exposé à la température pendant des temps variables et l'on a recherché le titre de virus résiduel.

A 60° la souche sauvage est partiellement inactivée en I5 minutes tandis que la souche lapinisée, la souche "29" sont totalement détruites ainsi que tous les clones qui en sont issus.

A 55° le virus sauvage est stable ; la souche lapinisée et la souche "29" subissent une inactivation particlle ; les clones se comportent de deux manières : certains ont la même sensibilité à la chaleur que les souches d'où ils proviennent; d'autres sont intensément inactivés : leur titre diminue de plus de 99% après exposition à 55° pendant I5 minutes.

A 50° le virus sauvage, la souche lapinisée et la souche "29", les clones partiellement inactivés à 55° sont stables : le titre de la suspension de virus chauffé à 50°pendant I5 minutes est identique à celui de la suspension de virus non chauffée. Plusieurs clones présentent une inactivation partielle : leur titre diminue de 90 à 99% après exposition à la température de50°.

Notons encore que la durée de l'exposition à la chaleur n'est pas un facteur important de l'épreuve : on obtient des résultats identiques si l'épreuve dure 5, I5 ou 20 minutes. La manière dont la température maximum est atteinte n'intervient pas et l'élévation progressive ou brutale de la température de la solution de virus provoque la même inactivation. Enfin la rapidité et l'intensité du refroidissement après l'épreuve n'ont aucune influence sur l'infectiosité résiduelle du virus. C'est la température maximum atteinte qui détermine l'inactivation du virus.
Nous avons recherché comment se déroulait en fonction du temps l'inactivation d'un clone du groupe I à différentes températures entre 50 et 55°. Le virus mis en suspension dans l'eau distillée a été exposé à six températures : 50, 5I, 52, 53, 54 et 55° pendant des durées allant jusqu'à 30 minutes. Le titrage de l'infectiosité résiduelle lors des différents prélèvements permet de tracer une série de courbes qui mettent en évidence l'inactivation du virus (fig.8).

L'examen des courbes d'inactivation du virus montre que le choix des températures 50 et 55° est justifié lorsqu'on veut éprouver la résistance de la capside vis-à-vis de la chaleur. Ces deux températures correspondent, avec une marge (± I°) d'une part à la stabilité du virus (50°) et d'autre part à l'inactivation du virus dans les conditions de l'expérience (55°). De plus alors que tous les clones de virus stables à 55° sont pathogènes pour le porc, aucun des clones totalement inactivés à 50° ne se montre aphtogène lorsqu'on l'inocule au porc.

Le chlorure de magnésium n'exerce aucune protection pour le virus aphteux sauvage ou atténué vis-à-vis de la chaleur. Il semble, au contraire, accroître l'action destructrice de la chaleur : un virus stable à 50° dans l'eau distillée devient totalement inactif à cette température lorsqu'il est en suspension dans du chlorure de magnésium. En d'autres termes le chlorure de magnésium inactive le virus dont la stabilité est amoindrie par l'agitation thermique (Tableau I6).

TABLEAU N° I6

Défaut d'action protectrice du chlorure de magnésium pour les virus aphteux de type O

	Titre initial	Titre résiduel en DCP_{50}/ ml					
		Eau (50°)	Cl_2 Mg. (50°)	Eau (55°)	Cl_2 Mg. (55°)	Eau (60°)	Cl_2 Mg. (60°)
Souche sauvage	500	500	500	500	500	50	0
Souche lapinisée	500	500	500	50	0	0	0
Clone thermo-résistant	500	500	500	50	0		
Clone thermo-sensible	500	50	0	0	0		

Il convient de noter que le type de virus aphteux, ou peut-être même la souche de virus pourraient jouer un rôle déterminant dans la protection conférée vis-à vis de la chaleur par le chlorure de magnésium.

Nous avons éprouvé par la chaleur plus de deux cents clones de virus provenant soit de la souche lapinisée, soit de la souche "29", en rejetant systématiquement ceux qui se sont révélés stables à 55°. Les virus sélectionnés font alors l'objet de deux clonages successifs.

L'épreuve à 50° permet de distinguer parmi les clones de virus ceux qui sont thermostables de ceux qui sont thermosensibles. Cette température est la plus favorable pour faire apparaître des différences entre les clones de virus : deux virus complétement inactivés à 55° peuvent très bien se révéler l'un sensible, l'autre résistant à 50°, bien que les 2 clones paraissent stables à une température plus basse (45°).

Nous distinguons ainsi les virus thermorésistants à 50°: Groupe
et les virus thermosensibles à 50° .....: Groupe
Le virus sauvage n'entre pas dans cette classification : il appartient au groupe 0.

Les clones de virus thermosensibles sont beaucoup plus nombreux dans la souche "29" que dans la souche lapinisée.

c) Rapports entre la sensibilité aux solutions acides et la sensibilité à la chaleur :

Les deux caractères étudiés se rapportant à la capside, on peut donc essayer de voir comment la sensibilité à la chaleur et la sensibilité aux solutions acides se superposent ou se distinguent pour un même virus. On peut établir un tableau théorique des diverses combinaisons des deux types de propriétés et voir

s'il correspond aux résultats expérimentaux.

TABLEAU N° I7

Tableau théorique
Combinaison des deux facteurs d'identification se rapportant à la capside

		Chaleur	
		sensible	résistant
pH	Sensible	3	2
	Résistant	2	I

Dans les groupes I et 3 les caractères se superposent : la sensibilité aux solutions acides correspond à la sensibilité à la chaleur tandis que la résistance aux solutions acides coïncide avec la résistance à la chaleur.
Dans le groupe 2 on trouve les virus qui ont des propriétés opposées : le même virus est sensible à la chaleur et résistant aux solutions acides ou bien il est sensible aux solutions acides et résistant à la chaleur.
Expérimentalement (tableau I8) on observe que certains virus résistants à l'action des solutions acides (pH 6,4) sont aussi résistants à l'épreuve de chauffage à 50° pendant I5 minutes (groupe I). Les clones sensibles à l'action des solutions acides peuvent être soit thermorésistants (groupe 2) soit thermosensibles (groupe 3). La plupart des clones thermosensibles sont aussi sensibles aux solutions acides (groupe 3).

TABLEAU N° I8

Tableau expérimental :

Combinaison des deux facteurs d'identification se rapportant à la capside

Virus	Témoin	Titre du virus résiduel en DCP_{50}/ml					
		Température			pH		Groupe
		50°	55°	60°	6,4 (1h)	6,2 (5')	
Sauvage	500	500	500	50	500	50	Groupe 0
Lapinisé	500	500	50	0	50	0	Groupe I
" 29 "	500	500	50	0	50	0	Groupe I
Clones pH résistants	500	500	50	0	50	0	Groupe I
Clones pH sensibles	500	500	50	0	0	0	Groupe 2
Clones thermosensibles	500	50	0	0	0	0	Groupe 3

La sensibilité des techniques de titrage du virus avant et après l'épreuve est assez grande : nous avons employé de manière parallèle la technique des dilutions limites et celle des plages selon Postlethwaite ; à IO DCP_{50}/ ml près les résultats sont superposables et reproductibles.

d) La stabilité des propriétés de la capside :

A partir des divers types de clones cultivés à 29° nous avons refait un clonage par dilution limite et nous avons étudié les caractères des virus ainsi obtenus. D'un virus résistant à

l'action des solutions acides on peut toujours isoler, en plus ou moins grande quantité, des clones de virus inactivés par les solutions acides ; de même à partir d'un virus stable à 50° on peut toujours isoler des clones thermosensibles. Mais nous n'avons jamais obtenu de clone résistant à partir d'un virus sensible : on peut donc penser que le passage du caractère "résistant" au caractère"sensible" représente une mutation difficilement reversible dans les conditions de culture de virus.

Si l'on cultive en série à 37° un virus très sensible à l'action de la chaleur, on note au fur et à mesure des générations successives que la thermo-résistance du virus s'accroît. Un clone cultivé à 29° est inactivé dans la proportion de 99,9% lorsqu'on l'éprouve à 50°, proportion qui tombe à 90% s'il a subi 3 passages à 37°.

TABLEAU N° I9

Stabilité des propriétés de la capside en fonction des conditions de développement du virus
(Virus 74I "7")

Température de développement	Témoin	Titre de virus résiduel en DCP_{50}/ml	
		I5' à 50°	I h à pH 6,4
29°	10^6	10^3	10^3
37°	10^6	10^5	10^3

On voit que si la sensibilité de la capside à la chaleur varie dans une certaine limite en fonction de la température de multiplication du virus le caractère sensibilité aux solutions acides reste fixe.

- Classification des virus non pathogènes à l'aide des épreuves in vitro portant sur les propriétés de la capside :

Les virus sauvages se situent en dehors de cette classification : ils manifestent une résistance aux solutions acides et à la chaleur beaucoup plus grande que les virus pas ou peu pathogènes. Deux types d'épreuves sont utilisables pour distinguer des groupes parmi les virus non pathogènes pour le boeuf : l'exposition à pH 6,4 pendant I heure, l'exposition à 50° pendant I5 minutes.

Virus = Acidorésistant ---------- thermorésistant ------ Groupe I
Virus = Acidosensible ---------- thermorésistant ------ Groupe 2
Virus = Acidosensible ---------- thermosensible ------- Groupe 3

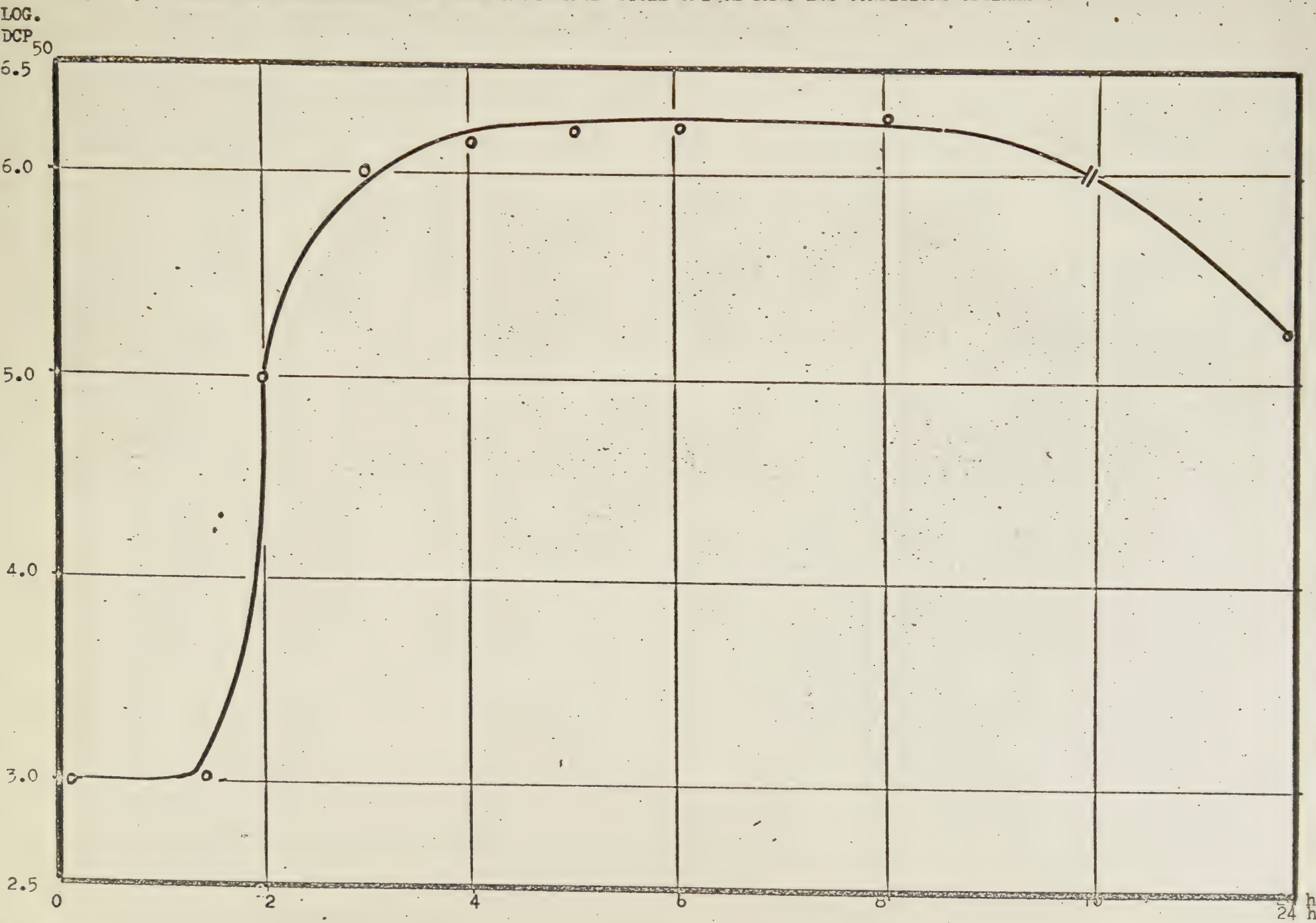
Nous avons essayé d'établir une corrélation entre ces caractères de la capside virale in vitro et l'absence de pouvoir pathogène pour les animaux spontanément sensibles. Le nombre de clones que l'on peut préparer étant pratiquement illimité, il importe de disposer d'un ensemble de techniques permettant de choisir pour les épreuves in vivo seulement, les virus dont on attend une réponse favorable.

Enfin nous avons essayé d'établir un rapport entre ces facteurs tenant à la structure de la capside du virus et les conditions thermiques du développement du virus.

II - La replication du virus

Nous étudierons successivement le développement du virus en cycle unique et la détermination du "rt" de chacun des clones isolés.

FIG. N° 9 - COURBE DE DEVELOPEMENT DU VIRUS APHTEUX EN CYCLE UNIQUE DANS LES CONDITIONS OPTIMALES



a) Le développement du virus aphteux en cycle unique

Les couches monocellulaires de rein de hamster (BHK 2I) sont infectées à une multiplicité de 2 à 5 DCP_{50} par cellule et la période d'adsorption est d'une heure à 37°. Après deux lavages avec du milieu de maintien et un lavage avec une solution à pH 6,2 destinée a éliminer le virus non adsorbé (59), la couche cellulaire est trypsinée et les cellules infectées mises en suspension à raison de 2 à 8 IO^5 cellules par ml de milieu de Earle-lactalbumine, contenant de l'extrait de levure, 2% de sérum de veau et 5% de méthyl cellulose. La suspension cellulaire est répartie sous une atmosphère d'air contenant 5% de CO_2 dans des flacons d'Erlenmeyer placés dans un bain marie agité dont la température est contrôlée à 0,I° près. A intervalles de temps réguliers on prélève 0,2 ml de la suspension de cellules infectées que l'on congèle dans du sérum de veau ; à la fin de l'expérience après deux congélations successives, les prélèvements sont titrés soit selon la technique des dilutions limites, soit selon la technique des plages (fig. n° 9).

- La phase de latence : les prélèvements réalisés entre 0 et I heure 30 après la mise en suspension des cellules ne sont pas infectieux (par suite des dilutions successives la détection du virus est impossible au dessous de IO^2 DCP_{50}/ml Les synthèses des divers constituants du virus sont réalisés au cours de cette phase.

- la phase de multiplication : A partir de la deuxième heure on obtient un titre de virus élevé, souvent voisin du maximum qui sera observé : 50% de la production totale de virus est réalisée entre une heure et deux heures après la fin de la période d'adsorption.

- Le plateau : Entre trois et six heures le titre du virus reste constant puis il diminue progressivement ; on peut interpréter le plateau comme un état d'équilibre entre la

production du virus et son inactivation. Quand la synthèse est terminée dans toutes les cellules on observe la diminution de l'infectiosité du virus exposé à la chaleur.

b) Détermination du "rt"

La technique du cycle unique appliquée aux différents clones de virus aphteux fait apparaître des différences dans leur multiplication in vitro. Nous avons éliminé les phénomènes liés à la température qui accompagnent l'adsorption et la pénétration du virus : pour tous les virus l'adsorption est réalisé en une heure à 37°.
Après la phase de pénétration selon la température d'incubation des cellules infectées le développement de chacun des virus est différent : pour chaque virus on obtient une courbe de croissance maximum dans une zone de températures déterminée et l'on appelle "rt" la température supraoptimale qui inhibe de 90% le rendement viral.

Nous avons comparé le développement à différentes températures du virus aphteux sauvage de type O et d'un certain nombre de clones isolés soit de la souche lapinisée soit de la souche "29".

Schéma de l'origine des divers clones étudiés

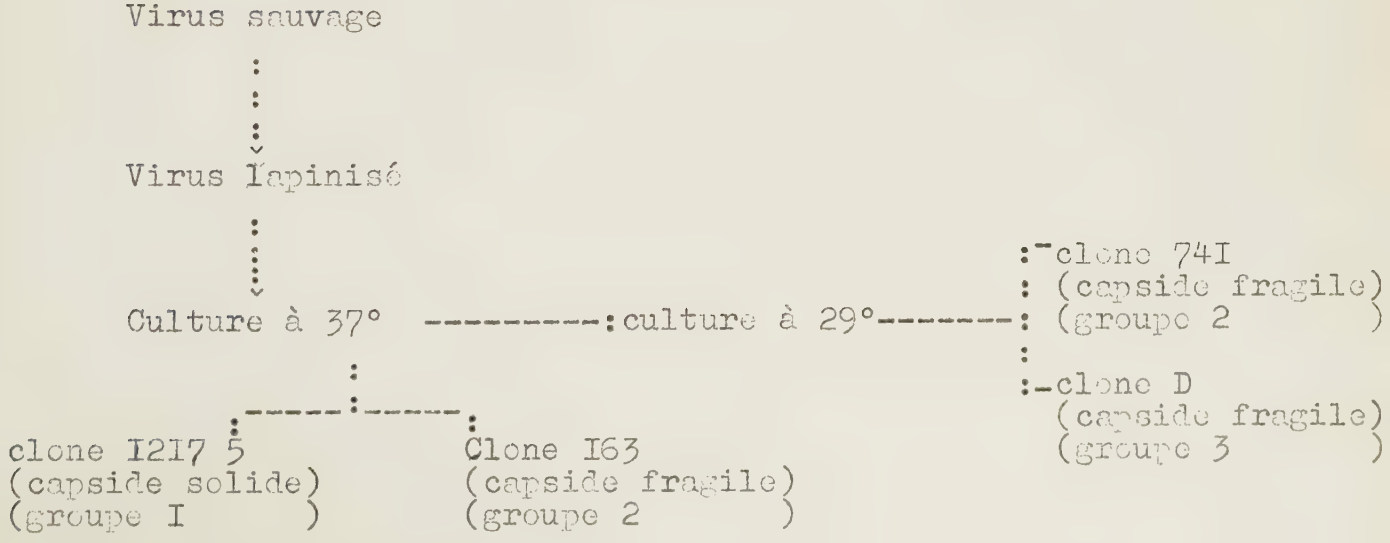


FIG. N° 10 - DEVELOPPEMENT DU VIRUS AFHTEUX SAUVAGE DE TYPE O A DIFFERENTES TEMPERATURES

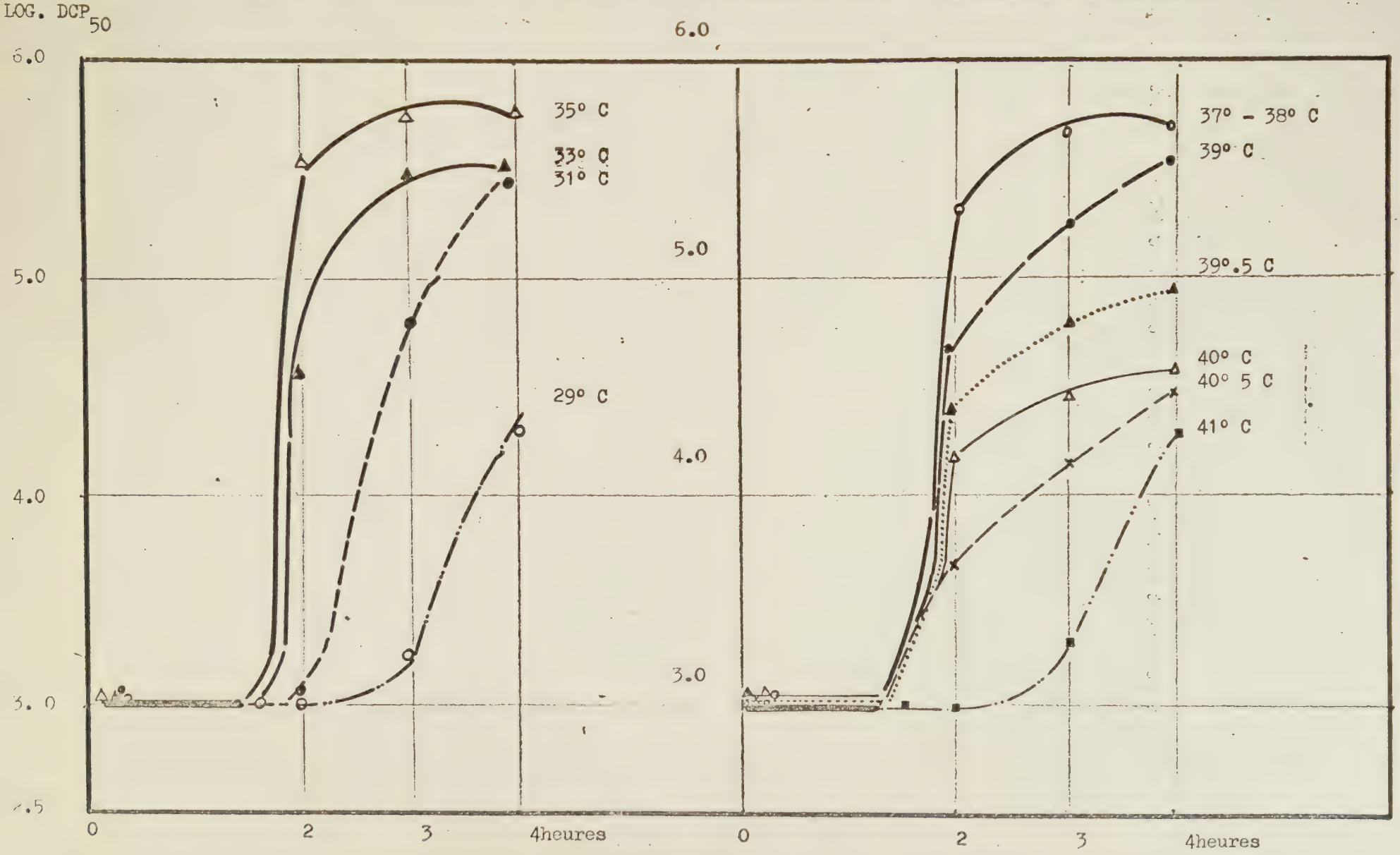


FIG. N° 11 – DEVELOPPEMENT DU VIRUS A 35 ET 29°

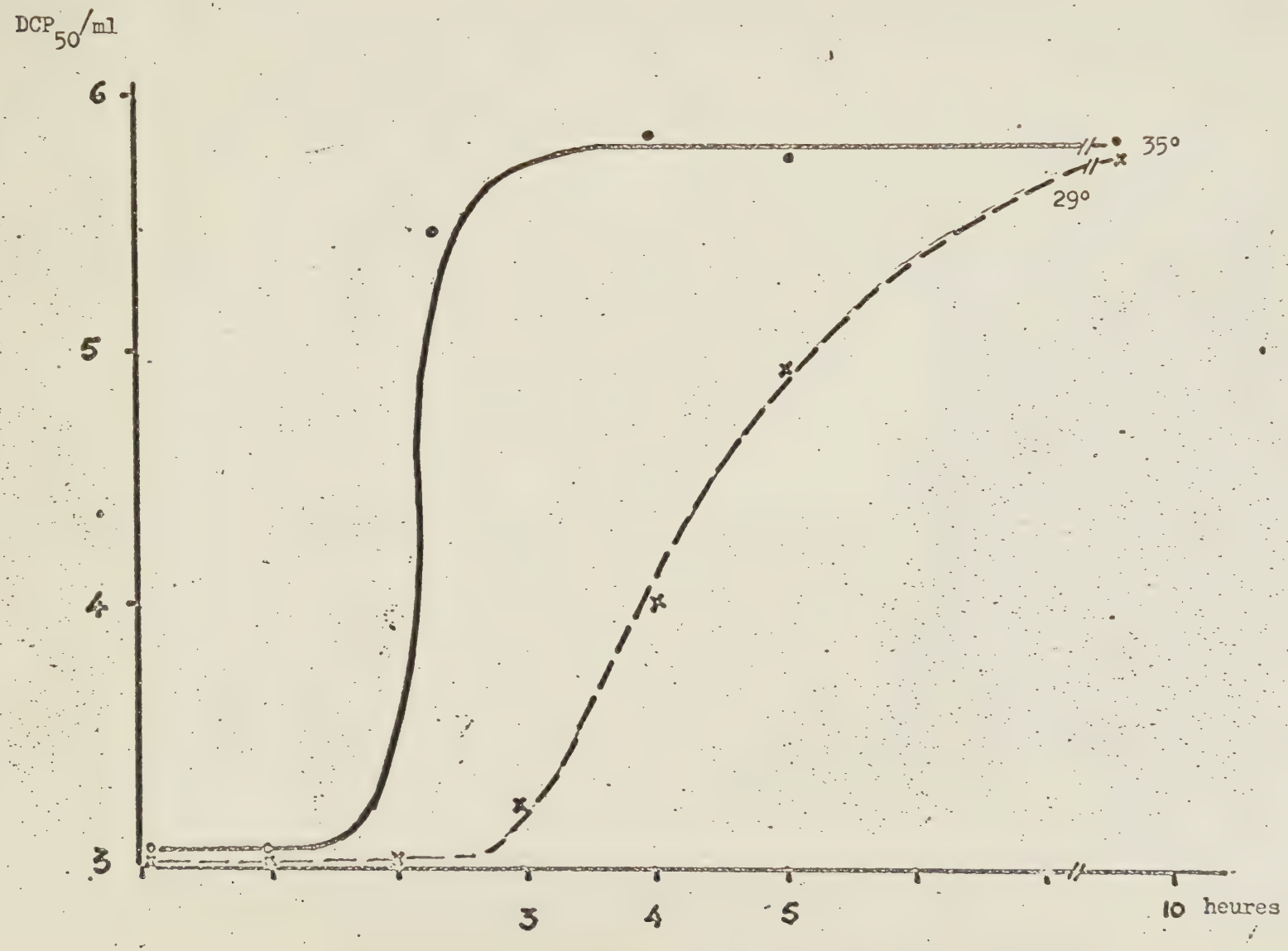
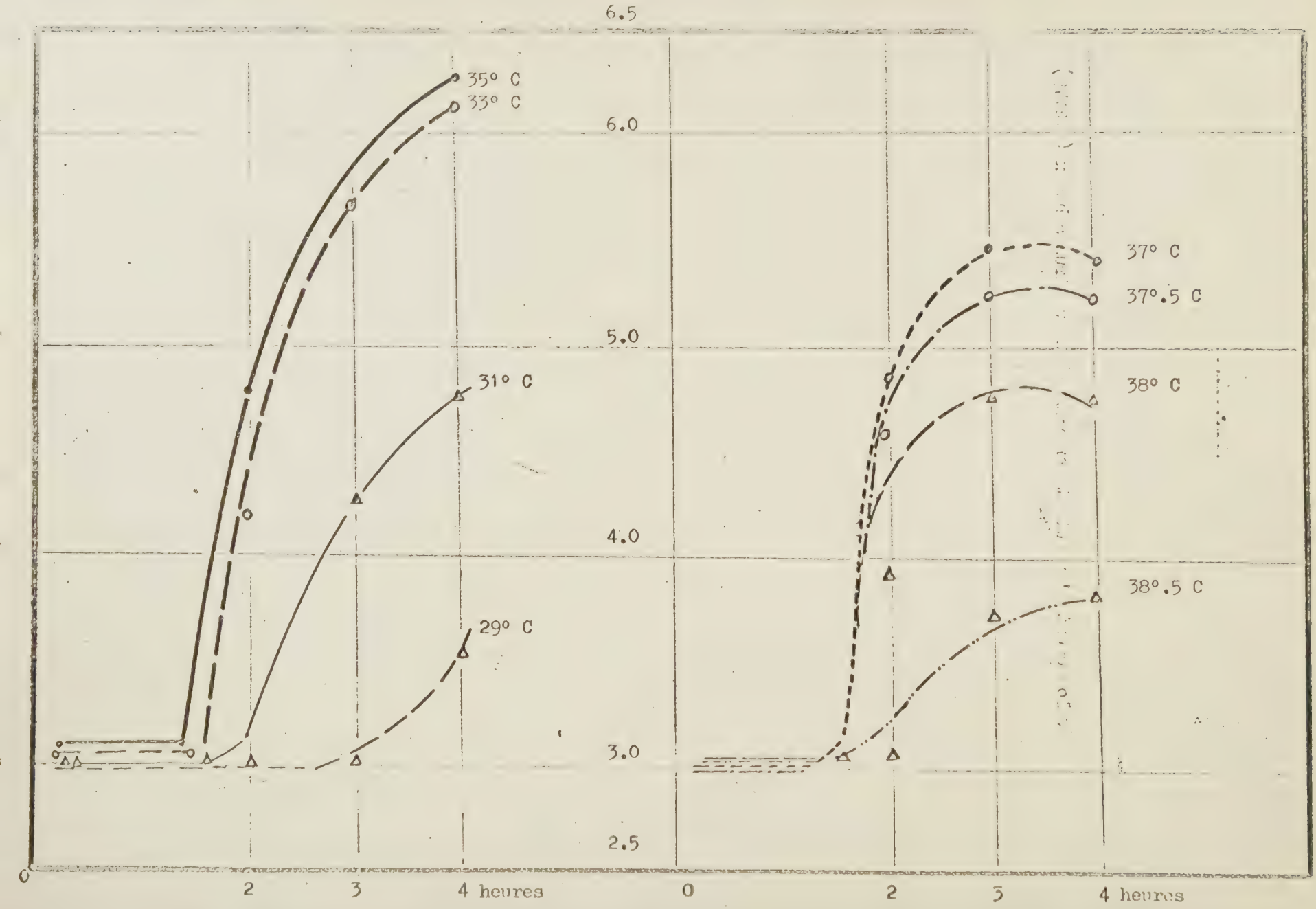


FIG. N° 13 - DEVELOPPEMENT D'UN MUTANT NON PATHOGENE DU VIRUS APHTEUX (O-12175)



- Les résultats :

La souche sauvage a été cultivée à 37°. Elle se multiplie avec un rendement maximum, dans une large gamme de température (de 32° à 38°5), qui est atteint trois heures après la mise en suspension des cellules infectées et le "rt" du virus sauvage est 39°8. L'étalement de la zone de température où le développement du virus est maximum est peut être lié au fait que la souche sauvage n'est pas clonée (fig. IO).
Aux températures infra-optimales la production de virion diminue progressivement et au dessous de 32° la phase de latence augmente ; à 29° la phase de latence est prolongée d'une heure et le taux d'augmentation du titre infectieux moins rapide, mais la multiplication du virus se manifeste pendant IO heures et le titre en virus est égal à celui qui est obtenu aux températures plus élevées (fig. II)
Aux températures supra-optimales la phase secondaire du cycle est atteinte : à 39°5 la quantité de virus produite diminue de moitié et à 40° elle n'est plus que de I% de la quantité de virus obtenue aux températures optimales. Au dessus de 40° toutes les phases de la synthèse semblent ralenties et le rendement en virion est très diminué (I% du maximum).
Les effets des températures supra et infra-optimales sont généraux et reproduisent ce qui a déjà été trouvé pour le virus de la poliomyélite ou pour le virus de la vaccine.

Le clone I2I7 5
Ce virus isolé à 37° a subi cinq passages à 29°. Les températures optimales de multiplication de ce virus sont comprises entre 32 et 35° : dans ces conditions l'infectiosité de la suspension cellulaire est maximum quatre heures après la mise en suspension des cellules et le "rt" est 37°5.
Si l'on a incubé les cellules infectées à 29 ou à 3I° (fig.I3) il faut attendre dix à quinze heures pour atteindre l'optimum du rendement : à quatre heures l'infectiosité n'est que le I% ou

FIG. N° 12 – DÉVELOPPEMENT DU VIRUS O-163 AU CYCLE UNIQUE A DIFFÉRENTES TEMPÉRATURES

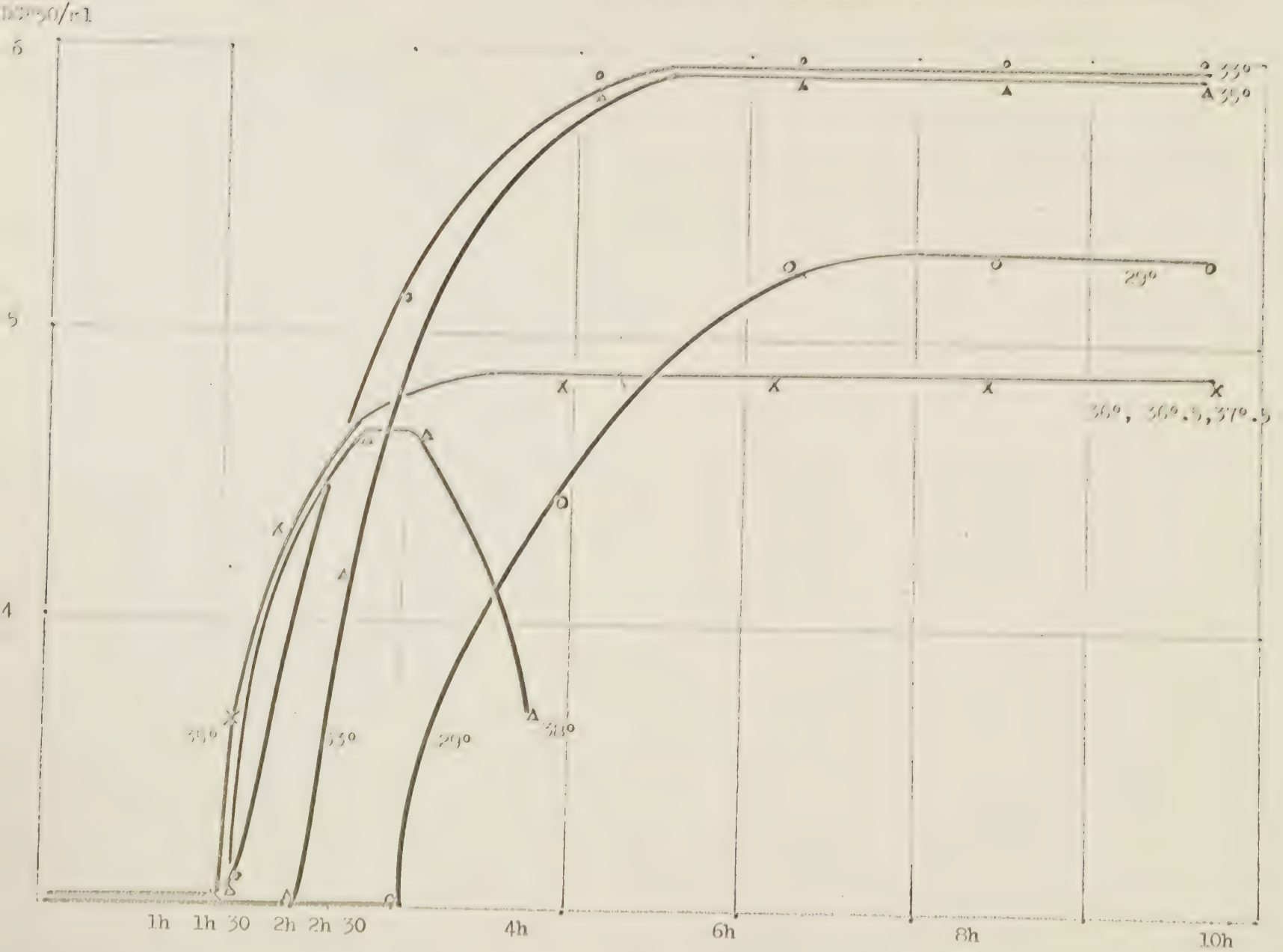
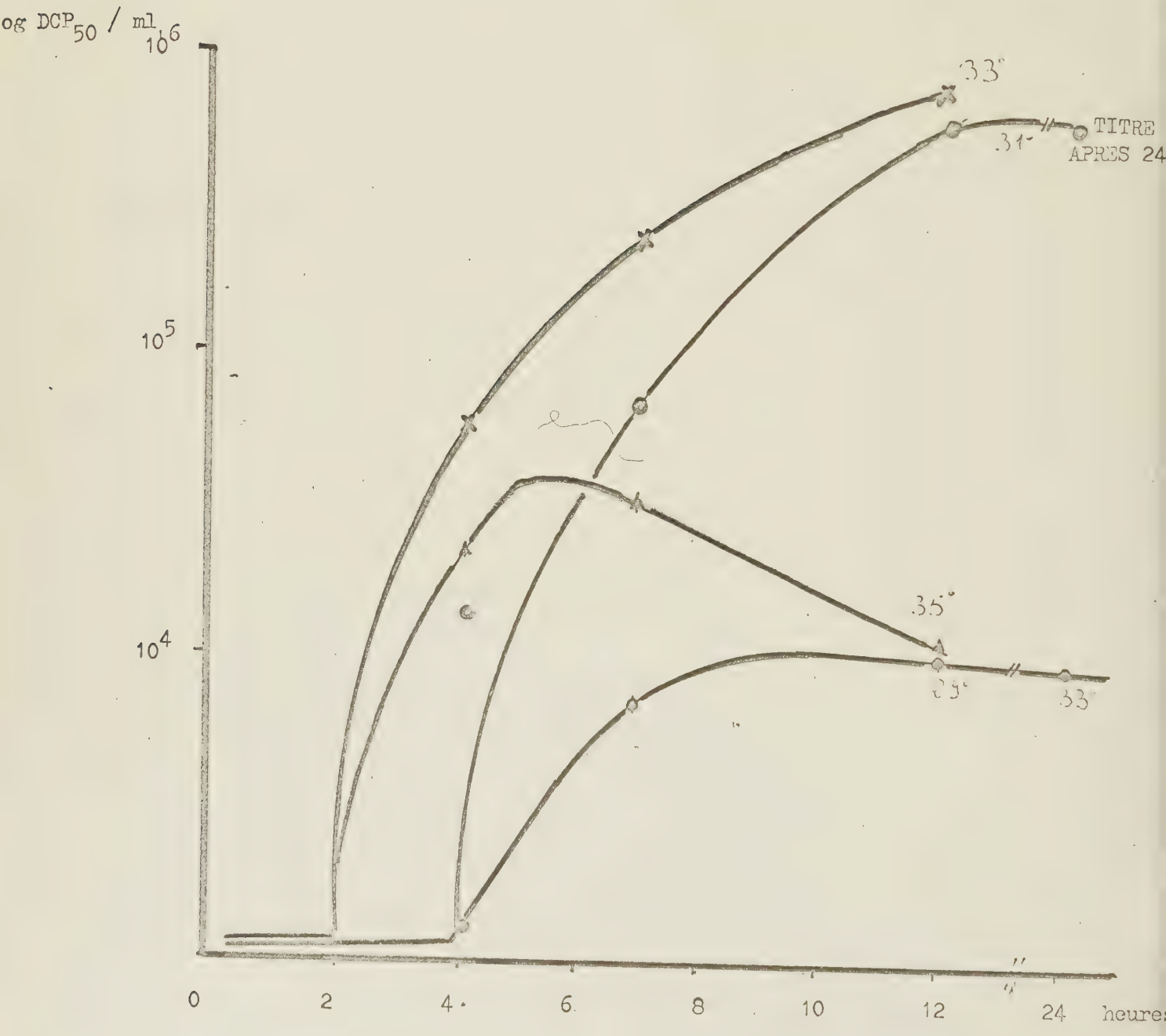


FIG. 15 - DEVELOPPEMENT DU VIRUS D A DIVERSES TEMPERATURES



le I°/oo de celle qui se manifestera ultérieurement ; la production du virus est ralentie mais pas diminuée.
A 38° le titre infectieux est très inférieur au titre maximum, le plateau correspondant à l'optimum de production est bref ; à 38°5 la production du virus est diminuée, la phase de latence prolongée et le titre infectieux diminue dès la troisième heure.

Le clone I63

Ce virus isolé à 37° a subi cinq passages à 37°. Il se multiplie dans les meilleures conditions entre 33 et 35° et atteint le titre maximum trois heures après la fin de l'adsorption et le "rt" est 36° (fig.I2).
A 33° on note déjà une phase de latence prolongée. A 29° la phase de latence dure deux heures trente et le titre maximum obtenu à la sixième heure reste toujours inférieur à celui que l'on trouve dans la zone de température optimale.
La température de 36° est située dans la zone supra-optimale : la quantité de virus obtenue est inférieure de 90% à celle qui est produite à 35°.
A 38° la multiplication du virus est précoce mais limitée ; quatre heures après la mise en suspension des cellules la multiplication du virus a cessé et on enregistre une importante inactivation du virus.

Le clone D

Ce virus isolé à 29°a été cinq fois cultivé à 29°. Le développement du virus est maximum dix heures après la mise en incubation à 3I° ou à 33° des cellules infectées : ce virus qui se caractérise par la lenteur de son cycle de développement a un "rt" de 35°.
Aux températures infra-optimales (fig. I5) la phase de latence est prolongée (trois ou quatre heures), et à 29° le titre maximum n'est jamais atteint même douze ou vingt quatre heures après le début de l'expérience.
A 35° l'apparition du virus est précoce mais le titre infectieux reste faible et tend à diminuer dès la quatrième heure.

FIG. N° 14 – DEVELOPPEMENT D'UN MUTANT NON PATHOGENE DU VIRUS APHTEUX – (O-741)

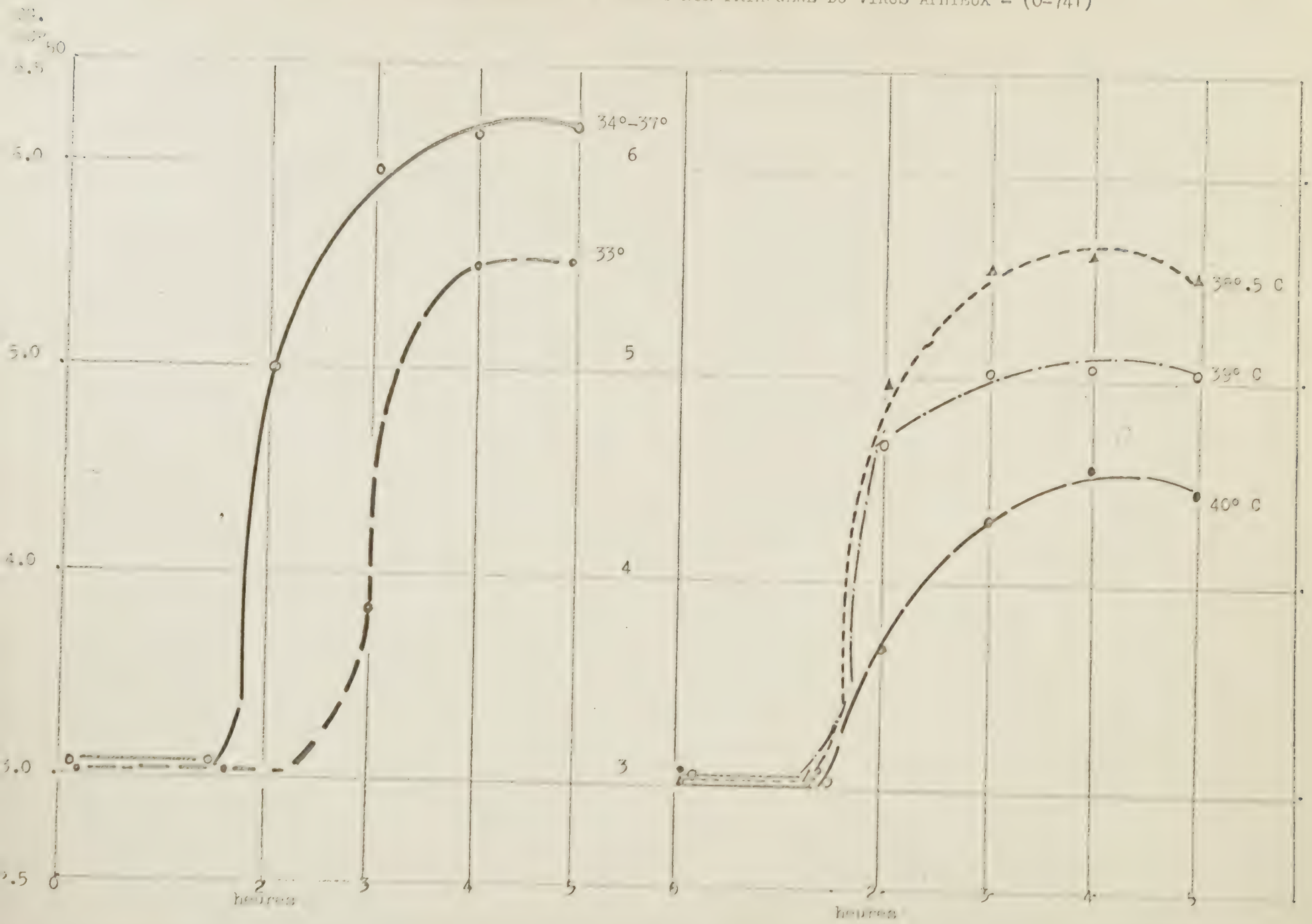
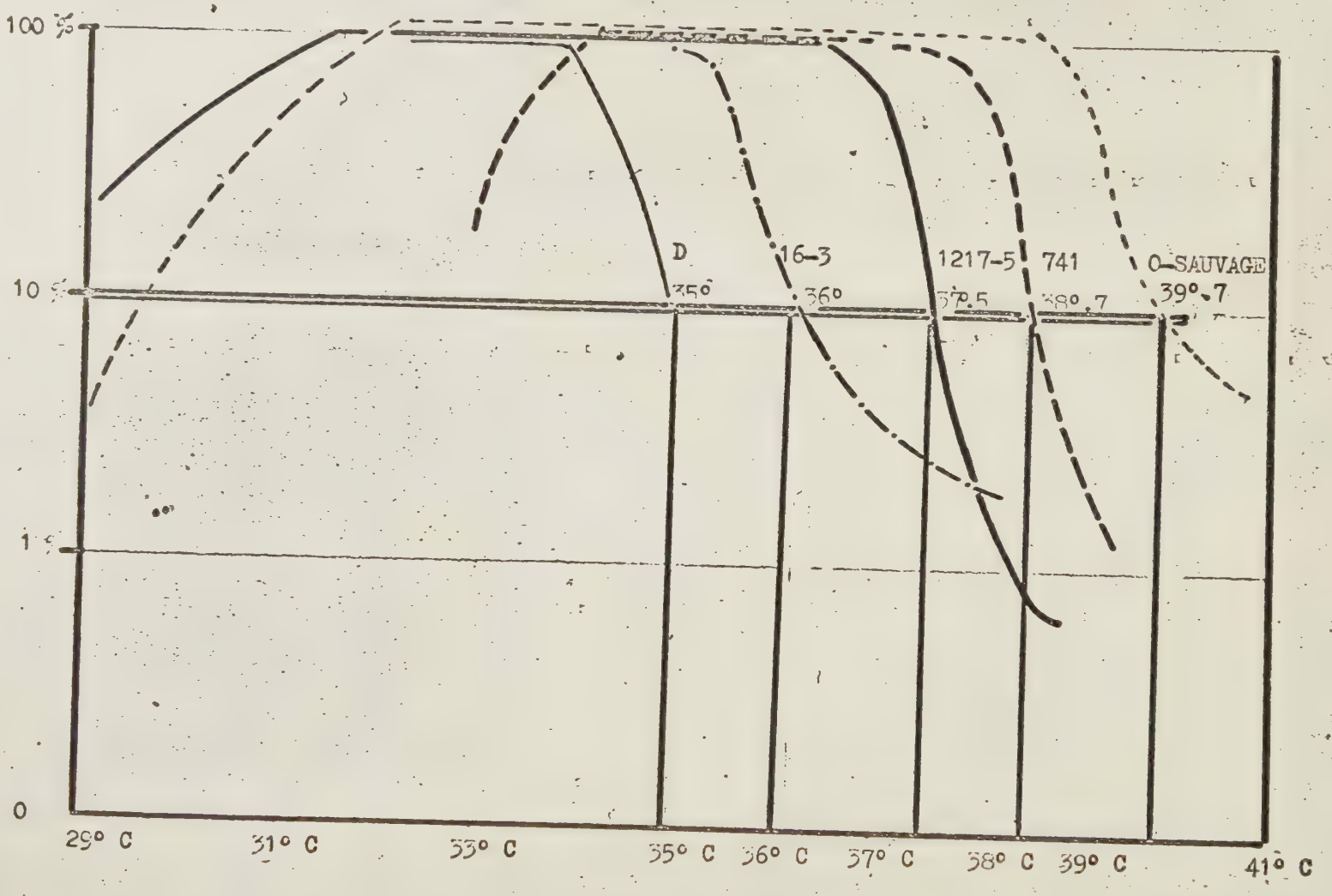


FIG. 16 – DETERMINATION DU RENDEMENT EN VIRUS A DIFFERENTES TEMPERATURES DU VIRUS APHTEUX SAUVAGE ET DE CERTAINS DE SES MUTANTS



Le clone 74I

Ce virus isolé à 29° a subi cinq passages à 37°. La zone de température, où le développement de ce virus est le meilleur, est située entre 34 et 38°. Le "rt" est 38°7 (fig.I4).
Aux températures infra-optimales (33°) la multiplication du virus est retardée : la phase de latence est de deux heures et le titre du virus reste faible.
A 40° la quantité de virus produite n'est que le I% de celle que l'on obtient à 38°.

- Discussion

- I°) Les courbes de rendement en virus en fonction de la température :

Si l'on compare les diverses courbes de rendement viral pour chacun des clones (fig. I6) on voit que la zone de multiplication optimale a une étendue variable.
La longueur du plateau peut refléter l'hétérogénéité de la souche étudiée, c'est le cas du virus sauvage qui n'a pas été cloné : chacun des composants de la population peut se multiplier intensément dans une zone de température limitée et la courbe est la résultante de toutes les courbes de rendement optimum ; on peut encore supposer une certaine complémentation entre les divers composants de la souche : les enzymes actifs dans une zone de température permettant la synthèse de virus dont les enzymes sont inactifs à la température imposée.

Les souches de virus dont le "rt" est bas se multiplient intensément dans des limites de température plus étroites que les souches qui ont un "rt" élevé : entre 35°5 et 36° le virus I63 voit son rendement limité à I0% de la valeur maximum ; le virus 74I connaît entre 37° et 38°5 toute une zone où son développement est inhibé de 40 à 90%.

Il est difficile de déterminer avec précision le "rt" des mutants très froids parce que les délais de production du virus

sont prolongés dans la zone des basses températures et parce qu'aux températures élevées l'inactivation du virus est importante et intervient pour raccourcir les périodes où le virus est produit.

La longueur du plateau dépend de l'activité de l'ARN polymerase de la morphogénèse du virion et de la stabilité de la particule virale infectieuse, il est difficile de dissocier ces trois facteurs. Brown a montré qu'entre 30 et 40° l'inactivation du virus tient à l'altération du génome et non à la destruction de la capside : cela apparaît bien si l'on compare le virus I63 ("rt" bas, capside fragile) et le virus 74I ("rt" élevé, capside fragile) : à 38° le premier s'inactive rapidement tandis que le second est parfaitement stable.

- 2°) Action de la température sur les différentes phases du cycle viral :

Nous envisagerons successivement la durée de la phase de latence, la pente et la durée de la phase de production logarithmique et le plateau de la courbe de développement.

- Durée de la phase de latence :

Aux températures optimales cette phase dure une heure trente pour tous les virus. Le virus D qui possède un "rt" très bas n'apparaît que deux heures après la mise en suspension des cellules infectées.

Aux températures supra-optimales la phase de latence reste identique à celle que l'on observe dans les conditions optimales. Mais pour chaque souche, à une température bien supérieure au "rt" cette phase se prolonge : par exemple à partir de 4I° pour le virus sauvage, ou de 38°5 pour le virus I2I75. Les deux virus se distinguent à la fois par leurs enzymes qui sont inactivés à des températures différentes, par leur morphogénèse qui est troublée dans des conditions différentes

et par leur sensibilité à l'inactivation par la chaleur. L'étude de mutants chauds permettrait de s'assurer que le fonctionnement du système cellulaire n'est pas altéré aux températures élevées ; toutefois Mhyra Ghapure a montré que jusqu'à 41° les cellules de hamster restaient capables de supporter la multiplication des petits virus à ARN.

Aux températures infra-optimales la phase de latence s'allonge à mesure que la température d'incubation s'abaisse. Au dessous de 33° même les virus qui se trouvent dans les conditions de développement maximum ont une période d'éclipse beaucoup plus longue : à 31° les virus D et I63 et une série de virus dont le "rt" est très bas n'apparaissent que trois ou quatre heures après le début de l'incubation. L'élaboration du virus est ralentie par des facteurs cellulaires qui interviennent vraisemblablement dans la synthèse des protéines.

Les températures supra-optimales modifient peu la phase de latence alors que les températures infra-optimales augmentent la durée de cette période ; de plus au dessous de 33° le ralentissement du fonctionnement des systèmes cellulaires utilisés par le virus vient ajouter à ce retard.

- La phase de croissance exponentielle :

Pour les différents clones de virus on peut comparer en fonction de la température la production de virus par unité de temps et la durée de la phase de production.

-- La pente de la courbe de production des virus :

Aux températures optimales la pente est d'autant plus accusée que le "rt" du virus est plus élevé : le virus sauvage, le virus 74I, le virus I2I75, le virus I63 et le virus D.

Les températures supra-optimales ne modifient pas la pente de la production du virus jusqu'au moment où la chaleur produit une inactivation marquée des enzymes de synthèse ou du virus : au delà de 41° pour le virus sauvage, de 38°5 pour le O I2I75, de 35° pour le virus D.

Aux températures infra-optimales la production de virus par unité de temps diminue progressivement : dans ces conditions l'inactivation du virus n'est pas en cause mais le ralentissement de la synthèse et du fonctionnement des enzymes nécessaires à son élaboration.

-- Durée de la phase de production exponentielle :

Dans les conditions optimales la cellule infectée par le virus sauvage synthétise la totalité des virions en une heure ; chaque cellule infectée produit I00 DCP_{50} en supposant que malgré la faible multiplicité d'infection toutes les cellules produisent du virus.

Aux températures supra-optimales la durée de la production de virus diminue à mesure que la température s'élève :

La souche sauvage produit du virus pendant une heure à 39° et 30' à 40°
Le clone 74I produit du virus pendant une heure trente à 37° et 30' à 38°5
Le clone I2I75 produit du virus pendant deux heures trente à 35° et une heure trente à 37°
Le clone I63 produit du virus pendant deux heures trente à 35° et 30' à 36°.

L'inactivation du virus n'est pas en cause : le virus I63 est aussi stable à 35° qu'à 36°, les pentes de production sont identiques aux deux températures : ni l'activité spécifique des enzymes ni la morphogénèse des virions ne sont changées.

On peut supposer que l'ARN polymérase est synthétisée à un taux plus élevé au début du cycle et que l'équilibre entre la destruction de l'enzyme par la chaleur et sa synthèse évolue plus vite à température élevée provoquant un arrêt précoce de la production de virus. Le virus D est inactivé dès 35° : il n'entre pas dans les exemples que nous présentons.

Aux températures infra-optimales plus on abaisse la température plus on allonge la durée du cycle viral :

2 h 30 pour le virus 74I à 33° au lieu de I h 30 à 37°
6 h pour le virus I2I75 à 3I° au lieu de I h 30 à 37°
4 h pour le virus I63 à 29° au lieu de 2 h 30 à 33°
I2 h pour le virus D à 29° au lieu de 8 h à 33°.

Le Q_{IO} des enzymes qui interviennent dans la synthèse du virion joue certainement un rôle dans cette modification de la durée de la production du virus par la cellule mais, de plus, à une même température chacun des clones se conduit de manière différente : plus leur "rt" est bas, plus la durée du cycle est longue. Pour le virus sauvage 29° ne constitue pas une température infra-optimale, mais le titre maximum de la culture n'est atteint qu'en IO h.

-- Le plateau de la courbe de développement :

= Dans les meilleures conditions cette période dure 6 ou 8 heures : les facteurs en jeu sont la production du virus et son inactivation par la chaleur ; le virus aphteux étant libéré en une seule fois de la cellule infectée il faut rapporter la durée de cette phase à l'asynchronie du développement du virus dans chaque cellule;

= Aux températures supra-optimales le plateau de production est bref : l'accélération du fonctionnement des enzymes régularise les diverses étapes du cycle viral d'une cellule à l'autre et l'inactivation du virus est intense.

= Aux températures infra-optimales l'asynchronie est plus marquée

d'une cellule à l'autre et le virus est stable hors de la cellule : il s'accumule dans le milieu et le plateau est long (I2 à I8 heures).

c) Conclusion

- L'action des températures aux divers stades du cycle viral pourraît être schématisée de la manière suivante :

--- Les températures supra-optimales n'agissent ni sur la durée de la phase d'éclipse ni sur la pente de la production de virus mais elles provoquent une interruption de la synthèse du virus et elles l'inactivent lorsqu'il est libéré hors de la cellule.

--- Les températures infra-optimales ralentissent la synthèse du virus à toutes les étapes du cycle viral : la phase de latence est prolongée, la pente de la courbe de production abaissée, la durée de la phase exponentielle allongée ainsi que le plateau.

- L'action de la température selon les clones :

Une même température (33°) peut être optimale pour le développement de certains clones (D , I63, I2I75) et infra-optimale pour d'autres (74I). De même 36° est une température optimale pour les clones 74I et I2I75 et supra-optimale pour les clones I63 et D. Dans cette gamme de température les facteurs cellulaires n'interviennent pas et les différences dans la multiplication des virus sont à rapporter aux propriétés de leur équipement enzymatique. La synthèse des protéines est un événement thermosensible. La sensibilité du développement viral, à la température variable d'un clone à l'autre, peut donc être rapportée à des différences dans la synthèse des protéines enzymatiques ou des protéines de structure. Les faits rapportés peuvent aussi s'interpréter si l'on met en cause la sensibilité à la chaleur de l'activité des enzymes qui interviennent dans la multiplication du virus.

III - Rapports entre les propriétés de la capside et les caractères du cycle viral :

En général les virus qui sont propagés à 37° ont un "rt" plus élevé que les virus cultivés à 29° : le "rt" des virus sauvage et 74I est supérieur à celui des virus I2I75 et D. Il est plus facile d'isoler des virus à capside fragile en réalisant le clonage à 29°: à partir du virus aphteux passé I30 fois sur lapin adulte puis cultivé sur cellules à 37° nous avons pu isoler 5 clones thermosensibles sur 40 étudiés ; en poursuivant les passages du même virus à 29° nous avons obtenu I0 clones thermosensibles sur 20 préparés. Le virus sauvage dont le "rt" est élevé (39°7) a une capside solide ; le virus D dont le "rt" est bas (35°) a une capside fragile (groupe 3). Jusqu'à présent nous n'avons pas trouvé de virus à capside fragile (groupe 3) dont le "rt" soit supérieur à 35°.

Cependant les deux caractères ne sont pas toujours superposés de manière aussi étroite : le virus 74I cultivé à 37° a un "rt" élevé (38°7) mais possède une capside fragile (groupe 2), tandis que le virus I2I75 cultivé à 29° a un "rt" de 37°5 et possède une capside solide (groupe I); le virus I63 isolé et cultivé à 37° a un "rt" de 36° et une capside fragile (groupe 2). Pringle (I5I) par des expériences de recombinaison de mutants a montré l'intervention de 5 ou 6 gènes dans la synthèse du virus : il est donc possible d'attribuer à des gènes différents les caractères de la capside et les propriétés de la polymérase de l'ARN viral.

C - ETUDE DES CLONES IN VIVO

I - Pouvoir pathogène

Les divers clones de virus ont été inoculés aux espèces animales expérimentalement ou naturellement sensibles au virus aphteux, à la dose de 10^6 DCP_{50} sous le volume de 0,1 ml chez les animaux de laboratoire ; chez les bovins et les porcins le virus a été inoculé d'une part en dix points par voie intradermique et d'autre part en un point par voie intramusculaire à la dose de 10^6 DCP_{50}.

1°) - le souriceau

Tous les virus que nous avons utilisés tuent le souriceau dans les trois jours qui suivent l'inoculation par voie péritonéale. Cependant, alors que pour les virus à capside solide le titre sur souriceau est pratiquement le même que le titre du virus en culture, il faut 100 DCP_{50} de virus thermosensible pour tuer le souriceau. Si l'on a affaire à un virus dont le "rt" est bas, le pouvoir de multiplication chez le souriceau est diminué et la mortalité se manifeste tardivement (quatre jours).

2°) - La souris adulte

L'action des divers types de clones n'a été étudiée que chez la souris Balb/C qui a montré la sensibilité la plus régulière au virus aphteux.
Les virus qui sont stables en milieu acide sont le plus souvent pathogènes pour la souris adulte surtout s'ils ont un "rt" élevé les animaux meurent en cinq jours en présentant des signes de paralysie ; si le "rt" du virus est bas, il se multiplie mal et ne provoque aucune maladie.
Les virus qui ont une capside fragile avec un "rt" élevé n'ont aucun pouvoir pathogène mais suscitent assez régulièrement (50% des animaux) une infection inapparente que l'on peut mettre

en évidence par des épreuves de virémie entre 24 heures et trois jours après l'inoculation du virus par voie intrapéritonéale. Si l'on a affaire à un virus fragile dont le "rt" est bas, il n'y a pas de multiplication et l'on retrouve dans le sang du virus provenant simplement de la diffusion du virus.

3°) - Le lapin adulte

Aucun des clones ne présente de pouvoir pathogène ni ne se multiplie chez le lapin adulte.

4°) - Le cobaye

Les clones qui sont stables en solution acide et qui résistent à l'action de la chaleur présentent un pouvoir pathogène très variable vis-à-vis du cobaye de 350 grammes inoculé par voie intradermoplantaire. Certains ont une virulence marquée et peuvent provoquer des lésions secondaires chez un faible pourcentage d'animaux (2/10) ; d'autres ne suscitent qu'une lésion peu spécifique au point d'inoculation ; d'autres enfin ne provoquent aucune réaction locale après l'injection du virus. Les clones à capside fragile n'ont aucun pouvoir pathogène pour le cobaye quelle que soit la dose inoculée.

5°) - Le boeuf

Les divers groupes de virus ont été inoculés chez le boeuf tant par voie intradermolinguale que par voie intramusculaire, car il arrive que l'injection intradermique se montre inoffensive alors que l'inoculation intramusculaire fait apparaître des aphtes. Chacun des clones a été injecté à une vingtaine de bovins par voie intramusculaire. Aucun des clones ne provoque de signe local ou général. Les virus à capside solide (groupe I) se multiplient chez le boeuf et provoquent une virémie fugace, cependant que les virus à capside fragile (groupe 3) ne suscitent que très irrégulièrement la virémie qui témoigne de la multiplication du virus chez le boeuf (40% des bovins).

6°) - Le porc

Chacun des clones a été inoculé dans un premier temps à dix porcs. Les virus qui ne provoquent pas d'aphte ont été injectés dans un second stade à vingt porcs. Les virus à capside solide (groupe I) provoquent des lésions localisées au point d'inoculation : le clone I2I7 5 dont le "rt" est bas provoque des aphtes chez 2/IO des animaux éprouvés.
Les clones à capsides fragiles sensibles à la chaleur ne provoquent aucune lésion chez l'animal inoculé. Les virus qui ont des propriétés identiques à celles du clone D ("rt" bas et capside fragile) sont totalement inoffensifs.
Les clones du groupe 2 ont un pouvoir pathogène qui est en rapport avec leur "rt". Le clone 74I est pathogène chez un faible pourcentage d'animaux (2/30). Le clone I63 est totalement inoffensif (50 porcs inoculés par voie intradermique ou intramusculaire).
Les clones du groupe 3 sont totalement inoffensifs.

II - Pouvoir immunigène

Nous avons recherché l'apparition des anticorps neutralisants chez la souris adulte, chez le boeuf et chez le porc, 2 ou 3 semaines après l'inoculation des divers types de clones. Les bovins ont en outre été éprouvés 3 semaines après l'inoculation du virus modifié à l'aide d'une souche de virus aphteux pleinement virulente de même type. Chaque fois que nous avons pu mettre en évidence la multiplication du virus par la virémie, nous avons retrouvé très vite des anticorps neutralisants dans le sérum des animaux. Les souches acidorésistantes et les souches thermorésistantes sont capables de provoquer la synthèse d'anticorps neutralisants. Les souches thermosensibles sont moins efficaces. Notons que certains clones thermosensibles sont immunigènes chez le porc et ne suscitent pas l'apparition d'anticorps neutralisants chez le boeuf. Seulement cinq clones thermosensibles ont fait jusqu'à présent l'objet d'études chez le boeuf et chez le porc.

D - CONCLUSION

Les facteurs d'identification se rapportent d'une part aux conditions de la synthèse d'enzymes nécessaires à la replication de l'ARN viral et d'autre part, à la structure de la protéine virale. Si l'on songe au devenir du virus chez l'animal vivant, on voit que le premier groupe de caractères est en rapport avec la multiplication intra-cellulaire du virus, tandis que le second groupe correspond à la capacité de diffusion du virus d'une cellule à l'autre.

Le virus aphteux sauvage se multiplie bien aux températures élevées, et il possède une capside solide : il est donc capable de se développer intensément non seulement chez l'animal normal dont la température interne est voisine de 38 ou 39°, mais encore lors de la réaction fébrile, conséquence de l'infection. Ce virus qui résiste bien à l'extérieur de la cellule va pouvoir se propager abondamment et infecter à chaque cycle, de très nombreuses cellules, de plus éliminé par les différentes secrétions et excrétions de l'animal, il demeure infectieux dans le milieu extérieur. Toutes les conditions sont réunies pour qu'apparaissent des lésions et pour que la contagion du virus d'un individu à l'autre soit favorisée.

Les mutants non pathogènes du virus aphteux ne se multiplient bien que si la température n'est pas trop élevée, et chez l'animal normal puisque leur optimum de reproduction est situé au-dessous de 37° ; toute hyperthermie va inhiber de façon intense leur pouvoir de reproduction. Ces virus sont peu stables à l'extérieur de la cellule : leur pouvoir de diffusion d'une cellule à l'autre est limité et leur protection dans le milieu extérieur, pratiquement nulle.

C H A P I T R E V I

D I S C U S S I O N

Si l'on modifie le milieu et les conditions de développement d'un virus, on sélectionne les mutants les mieux adaptés à ces nouvelles conditions : par exemple in vivo le virus sélectionné se multipliera bien dans les tissus d'un hôte naturellement insensible au virus aphteux ; in vitro la replication s'effectuera à des températures qui ne permettent pas le développement du virus sauvage. Les virus mutants ainsi préparés, souvent très différents les uns des autres, se distinguent de la souche de virus originale par plusieurs de leurs propriétés.

Nous allons décrire les caractères d'un mutant du virus aphteux obtenu par isolement en culture cellulaire à 37° d'un clone thermosensible, à partir d'un virus aphteux de type O adapté au lapin adulte. Nous le désignons par le symbole O.I63. Ce virus peut être défini comme un mutant capable de se multiplier chez le boeuf et chez le porc, sans provoquer de lésion, tout en suscitant l'apparition d'anticorps identiques à ceux que l'on met en évidence après la maladie naturelle : ce virus pourrait être éventuellement utilisé comme vaccin vivant dans la prophylaxie de la fièvre aphteuse. Nous montrerons d'abord quels sont les facteurs d'identification de ce virus in vivo et in vitro et nous suivrons l'évolution des marqueurs génétiques les uns par rapport aux autres : en particulier nous verrons comment, à la disparition du pouvoir pathogène pour les animaux spontanément sensibles, correspond le changement des propriétés de la capside et des caractères de la multiplication du virus in vitro. Nous essayerons alors d'exposer quels sont les facteurs qui déterminent le pouvoir pathogène d'un virus aphteux. Ensuite, nous rapporterons les techniques mises en oeuvre pour évaluer la stabilité des caractères de ce mutant lorsqu'il ne se trouve plus soumis aux agents qui ont permis de le sélectionner. Enfin nous décrirons selon quelles modalités ce mutant non pathogène est susceptible d'immuniser les animaux chez qui il est inoculé et quels développements nous voudrions donner à ce travail.

I - LES FACTEURS D'IDENTIFICATION DU VIRUS APHTEUX O.I63

Pratiquement chaque technique utilisée pour mettre en évidence le virus aphteux permet de montrer des différences entre la souche originale et les mutants sélectionnés par passage sur lapin adulte puis en culture cellulaire à 37° ; ces caractères se manifestent aussi bien in vitro qu'in vivo.

A - Les facteurs d'identification qui se manifestent in vivo

Nous voulons parler ici des divers aspects du pouvoir pathogène pour les espèces naturellement et expérimentalement sensibles.

I° - Absence de pouvoir pathogène vis-à-vis du boeuf et du porc

Les animaux reçoivent IO^6 à IO^7 DCP_{50} de virus par voie intradermique ou intramusculaire.
Chez le boeuf adulte, la virus n'a plus de pouvoir aphtogène lorsqu'on l'inocule par voie linguale ; si on l'injecte par voie intramusculaire, il se multiplie, ainsi qu'en témoignent les épreuves de virémie, sans provoquer de lésion musculaire ou d'aphtes au niveau des espaces interdigités et de la cavité buccale.

Chez le porc de 20 à 40 kilos, le virus inoculé par voie intradermique ou intramusculaire ne détermine aucune lésion ni aucun signe clinique.

2° - Le pouvoir pathogène vis-à-vis des espèces expérimentalement sensibles.

Pour le souriceau le mutant O.I63 a partiellement perdu son pouvoir pathogène : alors qu'il suffit de dix DCP_{50} de virus sauvage pour tuer le souriceau en 48 heures, il faut IO^3 DCP_{50}

de virus mutant pour provoquer en trois ou quatre jours la mort de l'animal.

Pour la souris adulte dans la plupart des cas, le virus aphteux sauvage est éliminé sans se multiplier ; le mutant sélectionné en culture cellulaire est doué d'une innocuité totale bien qu'il se multiplie intensément dans les cellules du pancréas.

Chez le lapin adulte, le virus sauvage ne se multiplie pas ; il en est de même pour le virus non pathogène.

Chez le cobaye, le virus sauvage provoque une généralisation de l'infection tandis que le virus O.I63 est totalement inoffensif.

B - Les facteurs d'identification qui se manifestent in vitro.

On peut classer ces marqueurs en deux groupes : ceux qui se rapportent au cycle de développement du virus et ceux qui tiennent à la structure de la capside.

I°- Le cycle de développement et le rendement thermique

Le virus sauvage se multiplie dans une large gamme de températures : les quantités de virus maxima sont obtenues entre 29 et 39° ; le "rt" est 39°8 (fig. n°I6). Au contraire le virus O.I63 ne se développe dans les meilleures conditions que dans une zone de température étroite : le "rt" est de 36° (fig. n°I6).

2° - Les propriétés de la capside.

Le virus pathogène conserve son pouvoir infectieux si on le chauffe à 55° pendant I5 minutes ou si on le met en suspension dans une solution à pH 6,4 pendant une heure.

Le mutant C.I63 chauffé pendant I5 minutes à 55° ou exposé à pH 6,4 pendant une heure perd son pouvoir infectieux aussi bien vis-à-vis des cultures cellulaires que des souriceaux. Ces facteurs physiques interviennent bien au niveau de la capside puisque l'on a extrait l'acide ribonucléique infectieux du virus aphteux inactivé par la chaleur à 55° ou par les solutions acides. Dans les conditions où nous réalisons ces épreuves, le pouvoir infectieux de l'acide nucléique ne peut pas être mis en évidence.
Le tableau n° 20 permet de résumer les propriétés des deux virus.

TABLEAU N°20

Les marqueurs génétiques du virus O I63

	In vivo				In vitro	
	Pouvoir pathogène en $\frac{DI_{50}}{DE_{50}}$ / ml de culture				Pourcentage d'inactivation	
	Boeuf	Porc	Souriceau	Cobaye	pH 6,4 (I heure)	Chaleur 55° (I5 mn)
virus sauvage	$I0^7$	$I0^6$	$I0^6$	$I0^5$	0	0
virus O I63	0	0	$I0^3$	0	99	90

Le virus sauvage et le virus O I63 ont été cultivés à 35° ; leur titre a été ajusté à $I0^7$ DCP_{50}/ ml.

Cet ensemble de marqueurs génétiques permet de prévoir quel sera vis-à-vis du boeuf et du porc le comportement d'un virus dont on a déterminé au préalable un certain nombre de propriétés

in vitro et in vivo sur les animaux expérimentalement sensibles. Cette corrélation entre les facteurs d'identification se manifeste plus clairement encore si l'on suit l'évolution des différents caractères du virus au cours de la sélection des mutants non pathogènes.

II - L'APPARITION DES FACTEURS D'IDENTIFICATION EN FONCTION DE LA TECHNIQUE DE SELECTION DES MUTANTS NON PATHOGENES

Si l'on compare les propriétés des mutants à celles du virus sauvage durant les diverses étapes de la sélection, on met en évidence une série de rapports entre les aspects du pouvoir pathogène du virus et son comportement in vitro.
Le virus sauvage provoque l'apparition d'aphtes chez le boeuf, le porc et le cobaye ; in vitro, il se développe à des températures supérieures à 39° et il présente une grande stabilité vis-à-vis des solutions acides (pH 6,2) et de la chaleur (60°)

Au cours de l'adaptation au lapin adulte, les mutants n'ont plus qu'un pouvoir aphtogène limité mais se développent de façon plus marquée dans les muscles du boeuf, du porc, du cobaye ; certains ont même la propriété de se multiplier intensément dans le muscle cardiaque ; les souris adultes, quelle que soit leur race, meurent en présentant des signes de paralysie comme le lapin adulte. In vitro ces virus se développent à 39° mais leur pouvoir infectieux est sensible aux températures élevées (60°) et aux solutions acides (pH 6,2). Le virus lapinisé est très hétérogène et par lyophilisation on élimine les virions fragiles et on sélectionne les virions à capside solide ; une suspension de virus lapinisé titrant 10^7 DL_{50} souriceau/ml et s'avérant inoffensive pour le boeuf ne titre plus que 10^3 DL_{50} souriceau après lyophilisation et fait apparaître des aphtes chez plus de 50% des bovins inoculés.

La sélection de mutants capables de se multiplier à 29° dans les cultures de rein de porc permet d'obtenir une souche O 29 qui infecte le boeuf et le cobaye de manière inapparente alors que le porc inoculé par voie intradermique présente des aphtes qui restent localisés au point d'inoculation. Le lapin adulte n'est plus sensible à ce virus de même que les souris adultes C3H et Swiss ; les souris adultes C57 Black/6 et Balb/C sont tuées par l'injection de 10^5 DCP_{50}. In vitro ces virus ne se multiplient pas au-dessus de 39°; leur pouvoir infectieux est détruit par exposition aux températures élevées (60°) et aux solutions acides (pH 6,2) mais ils sont stables à pH 6,4.

Des clones isolés à partir de la souche O 29 peuvent être classés par des épreuves in vitro et l'on constate qu'à chaque groupe correspond un pouvoir pathogène déterminé pour le porc.

Les mutants stables à pH 6,4 pendant une heure sont en général résistants à l'inactivation par la chaleur (15 minutes à 55°) et possèdent un "rt" voisin de 38° : ces virus du groupe I ont donc les mêmes propriétés que la souche O 29 d'où ils proviennent. Les virus dont l'infectiosité est détruite à pH 6,4 se distinguent les uns des autres par leur stabilité à 50° : ceux du groupe 2 sont partiellement inactivés en 15 minutes à 50° et ont un "rt" voisin de 37° ; seuls les virus du groupe 3 sont doués d'une inocuité totale à l'égard du boeuf et du porc et présentent un pouvoir pathogène atténué pour le souriceau.

Le tableau n° 21 permet de suivre l'évolution des différentes propriétés des virus au cours des sélections réalisées :

TABLEAU N° 2I

Corrélations entre les divers facteurs d'identification

Virus	Pouvoir infectieux d'un ml de culture titrant 10^7 DCP_{50} : Boeuf	Porc	souriceau	Pourcentage d'inactivation pH : 6,2	6,4	Température : 60°	55°	50°
Sauvage	10^7	10^6	10^6	0	0	90	0	0
Lapinisé	10	10^6	10^7	90	0	90	0	0
O 29	0	10	10^6	90	0	90	0	0
Clones gr. 1	0	10	10^6	90	0	90	0	0
Clones gr. 2	0	10	10^6	99	90	99	90	0
Clones gr. 3	0	0	10^3	99	99	99	99	90

Tous les virus ont été cultivés à 35°. Leur titre a été ramené à 10^7 DCP_{50}/ ml avant d'être inoculé au boeuf et au porc par voie intradermique ; au souriceau par voie intrapéritonéale. L'inactivation in vitro a été étudiée sur 500 DCP_{50} de chacun des virus.

La corrélation entre la structure de la capside et la température optimale de développement d'un virus n'est pas absolue : nous avons isolé des virus à capside fragile et à "rt" élevé ainsi que des mutants à capside solide et à "rt" bas , leur étude nous a permis d'aborder le problème du pouvoir pathogène.

III - LES FACTEURS QUI DETERMINENT LE POUVOIR PATHOGENE D'UN VIRUS APHTEUX

Si l'on compare les qualités des virus à chacune des étapes décrites, on peut essayer de mettre en rapport les manifestations des virus in vivo et in vitro.
Le virus sauvage qui se caractérise par un pouvoir pathogène intense est un virus à capside solide capable de se multiplier in vitro à des températures supérieures à 39°. Les virus qui montrent une inocuité totale pour les animaux spontanément sensibles sont des virus dont la capside est fragile et qui se multiplient mal au-dessus de 37°.

La fragilité de la capside est vraisemblablement liée à une distribution des liaisons hydrogène un peu différente de celle du virus d'origine: les agents qui détruisent l'infectiosité de ces virus sont précisément ceux qui sont connus pour rompre les liaisons hydrogène. Un virus fragile introduit dans un organisme sensible, même s'il est produit en quantité normale dans la cellule, subit une destruction importante lorsqu'il est libéré hors de la cellule après le premier cycle de multiplication. On peut également penser qu'au moment où le virus est adsorbé à la surface de la cellule, il subit une déformation d'autant plus importante que sa capside est fragile, ce qui pourrait empêcher sa décapsidation dans le cytoplasme cellulaire. Le nombre de cellules atteintes par la seconde génération de virus sera donc beaucoup plus faible que lorsque l'organisme est infecté par un virus à capside solide.

La seconde propriété des virus non pathogènes est de posséder un "rt" bas : leur température optimale de multiplication est en moyenne inférieure de deux à trois degrés à celle du virus sauvage ; certains mutants ont même un "rt" de 32° mais ne se multiplient pas chez les mammifères. On pense qu'aux températures

supra optimales, l'ARN polymerase est synthétisée sous une forme inactive ou n'est pas synthétisée. Dans ces conditions, l'on conçoit que les mutants à "rt" bas se repliquent faiblement ou pas du tout chez les animaux dont les tissus musculaires ont une température de trois ou quatre degrés supérieure au "rt" du virus. De plus, la multiplication des mutants non pathogènes du virus aphteux va être beaucoup plus sensible aux réactions hyperthermiques de l'hôte que la multiplication du virus sauvage.

Cependant, si l'on considère que la température d'un bovin adulte est 38°6, que celle du veau est de 39 à 40°, et que la température du porc est 39°5, on comprend mal que les mutants dont le "rt" est bas soient tout de même plus pathogènes pour le veau et pour le porc que pour les bovins adultes. La gamme de température de multiplication d'un virus n'apparaît donc pas comme le seul facteur déterminant le pouvoir pathogène et, en particulier, des facteurs différents doivent intervenir chez l'adulte et chez le jeune. Les jeunes synthétisent beaucoup moins d'interferon que les adultes ; le nombre de cellules lésées nécessaires à la manifestation clinique de l'infection est vraisemblablement plus faible chez le jeune que chez l'adulte. On peut penser que le jeune possède moins de substances extracellulaires capables d'inactiver le virus ou même qu'à une température donnée, la multiplication intracellulaire du virus est plus intense chez le jeune que chez l'adulte.

On peut donc admettre que les deux composants du pouvoir pathogène du virus aphteux sont, d'une part l'intensité de sa multiplication intracellulaire et, d'autre part, sa capacité de diffusion dans l'organisme de l'hôte. Le premier de ces facteurs se manifeste in vitro par le "rt" : un virus dont le "rt" est bas ne produit qu'une petite quantité de virions dans la cellule infectée à une température supra optimale ; le second se manifeste in vitro par la sensibilité du pouvoir infectieux aux solutions acides ou à la chaleur : de la

s·li'ité de la capside dépend la stabilité du virus dans le milieu extra cellulaire. L'effet de ces deux composants est additif : le déroulement de l'infection par un mutant non pathogène chez un animal sensible est plus lent que l'infection produite par le virus sauvage correspondant : la quantité de virus produite par chaque cellule infectée est plus faible, une quantité plus importante de virions est détruite au cours de la diffusion de cellule à cellule. Lors des cycles de multiplication ultérieurs, le virus va se trouver en présence d'interferon (74, I63) ou même d'anticorps que l'organisme infecté aura eu le temps de produire ; la multiplication des virus non pathogènes a donc une durée plus courte que celle du virus sauvage.

IV - CONDITIONS D'ETUDE DE LA STABILITE DES MUTANTS

Tout changement de la température, du tissu, de l'espèce animale, du milieu dans lequel le virus se multiplie, favorise la sélection de virions possédant une capacité plus grande que le virus d'origine à se développer dans les nouvelles conditions. Un mutant non pathogène du virus aphteux remis dans des conditions de développement qui sont optimales pour le virus sauvage devrait théoriquement faire l'objet d'une sélection inverse : en particulier, si l'on emploie comme vaccin vivant un tel mutant chez le boeuf ou chez le porc, il va se multiplier dans un système où l'apparition du virus sauvage est favorisée.
Les épreuves de stabilité que nous effectuons in vivo consistent à passer six fois en série le virus sur bovin puis à contrôler ses divers facteurs d'identification in vitro.
Les mutants non pathogènes du virus aphteux sont le résultat d'une longue sélection in vivo et in vitro et les clones utilisés se comportent comme des populations homogènes. Ils ont donc les mêmes chances de subir une nouvelle sélection lorsqu'ils se multiplient chez le boeuf ou chez le porc. Dans ces conditions tous les facteurs d'identification sont restés stables : le virus obtenu après six passages chez le boeuf garde tous les caractères du mutant non pathogène.
La durée de la multiplication de ces mutants chez les animaux naturellement sensibles est brève ; ils se trouvent à une température de développement supra optimale, ils sont fragiles et diffusent mal d'une cellule à l'autre, le cours de l'infection est bientôt interrompu par l'interferon et les anticorps spécifiques.
Enfin, ces virus ne sont pas contagieux : ils ne sont que peu ou pas excrétés, ils persistent mal dans le milieu extérieur, ils sont difficilement transmissibles d'animal à animal. Ils ont donc très peu de chances de réaliser, lors de leur emploi comme vaccin, un nombre de cycles suffisant pour permettre à la sélection inverse de se produire.

L'existence de porteurs de virus chez les bovins vaccinés qui ont subi ultérieurement une infection expérimentale avec un virus pathogène fait craindre l'intervention d'un phénomène analogue lors de l'emploi d'un vaccin à virus vivant.Le maintien prolongé d'un mutant non pathogène dans l'organisme du boeuf ou du porc pourrait à la longue provoquer une sélection des virus les plus aptes à se multiplier chez l'hôte naturellement sensible. La persistance du virus (55) dans les différents tissus de l'animal après la vaccination devra faire l'objet d'une expérimentation particulière.

In vitro nous avons de même procédé à la culture à 37° de virus isolés et propagés à 29°. Les virus ainsi obtenus ont été clonés : la plupart des clones ont conservé leur capside fragile et leur "rt" n'a subi qu'une légère augmentation : les autres facteurs d'identification restent stables.

Nos contrôles sont insuffisants et devront être réalisés dans des conditions telles que les chances de mutation reverse soient statistiquement définissables, précisant ainsi les limites de stabilité d'un virus que l'on désire utiliser comme vaccin.

V - L'IMMUNISATION PAR LES MUTANTS NON PATHOGENES DU VIRUS APHTEUX

Pour qu'un mutant soit capable d'immuniser de façon utile les animaux auxquels il est inoculé, il doit, d'une part, avoir conservé une structure antigénique aussi voisine que possible de celle du virus sauvage et, d'autre part, rester capable de se multiplier dans les tissus de l'animal.

La persistance de la structure antigénique du virus au cours des adaptations et des sélections successives subies par les mutants non pathogènes, suppose une grande stabilité de ces motifs : alors que la capside est rendue fragile par un réarrangement des liaisons hydrogène, et que l'équipement enzymatique subit des changements importants, le pouvoir infectieux de la particule virale reste neutralisable par le sérum étalon spécifique du virus sauvage. Réciproquement, les anticorps suscités par les divers mutants conservent une grande affinité pour le virus sauvage suffisante pour le neutraliser, ce qui montre que la composition en acides aminés de la protéine de structure varie peu d'un mutant à l'autre ou que les mutations siègent au niveau de sites cachés. Des épreuves de séroneutralisation intratypique ou des épreuves quantitatives de fixation du complément permettent dans le cas de virus de la poliomyélite de distinguer le virus sauvage de ses mutants. Il convient de reconnaître qu'un mutant qui aurait perdu son pouvoir pathogène spécifique et ses caractères antigéniques originaux, serait bien difficile à identifier en tant que virus aphteux. On peut donc penser que les méthodes de détection que nous avons utilisées nous ont permis de sélectionner les mutants antigéniquement stables.

Ce qui distingue fondamentalement l'immunisation par virus vivant de la vaccination par virus inactivé par le formol et la chaleur, c'est que le virus vivant doit se multiplier dans

les cellules de l'hôte qu'il va protéger : en effet, on utilise dans ce cas, cent fois moins d'antigène que lorsqu'on utilise un vaccin tué. Si l'on inactive d'une manière quelconque le virus non pathogène, son pouvoir immunigène devient très faible aux doses utilisées (IO^5 - IO^6 DCP_{50} souriceau) ; toutefois, si on l'injecte à dose massive, il peut provoquer l'apparition d'anticorps spécifiques : il se comporte alors comme un vaccin inactivé. La virémie qui suit l'injection du virus vivant correspond à la multiplication du mutant non pathogène dans les muscles du boeuf : la quantité de virus retrouvée est de cent à mille fois supérieure à celle qui a été inoculée. Tous les animaux ayant présenté une virémie sont résistants à l'infection d'épreuve ; parmi les bovins chez lesquels le virus n'a pas été décelé par l'existence d'une virémie transitoire, certains sont cependant parfaitement immunisés : cela tient à ce qu'un seul prélèvement de sang étant réalisé par 24 heures, la virémie échappe à nos investigations dans les conditions expérimentales mises en oeuvre. La multiplication du virus dans l'organisme correspond à une production massive d'antigène et à une diffusion du virus au niveau du système réticulo endothelial ce qui rend compte de l'intensité et de la précocité de la réponse en anticorps. Si l'on éprouve quantitativement la résistance des sujets selon la technique de Lucam, on voit que les bovins résistent à des doses très élevées de virus sauvage. Cette immunité se manifeste souvent comme un phénomène de tout ou rien : ou bien les individus vaccinés présentent une résistance totale, ou bien ils se comportent comme des animaux neufs. On peut admettre que les animaux restés sensibles sont ceux chez qui le virus ne s'est pas multiplié lors de l'infection active par le mutant non pathogène. Avec l'immunisation classique, on peut observer des degrés intermédiaires de résistance au virus sauvage qui sont marqués par la résistance de l'individu aux faibles doses de virus et la sensibilité aux doses importantes de virus d'épreuve ; dans le cas de l'immunisation par le virus vivant,

il semble que, généralement, la résistance du vacciné soit indépendante de la dose d'épreuve. Le pouvoir de multiplication chez le boeuf varie selon les clones de virus : certains sont capables de se multiplier chez plus de 90% des animaux inoculés, d'autres issus de la même souche ne se développent que chez 50% des bovins, d'autres qui manifestent in vitro une fragilité marquée ne provoquent une virémie que chez I0 à 20% des sujets vaccinés.

On voit l'intérêt que présente l'étude in vitro des propriétés du virus pour rendre compte de ces différences entre les clones de virus, et pour choisir, en vue de l'emploi comme vaccin vivant, ceux qui sont le mieux capables de se multiplier chez les animaux à protéger. Les bovins ou les porcs chez lesquels le virus non pathogène s'est multiplié se comportent comme les individus qui ont subi la maladie naturelle et qui ont guéri : l'immunité obtenue est de très bonne qualité, elle s'étend à plusieurs sous-types de virus, elle s'établit vite après l'injection du vaccin et elle persiste longtemps.

VI - DEVELOPPEMENT DE CES RECHERCHES

Les facteurs d'identification déterminés pour le virus aphteux O, non pathogène et immunigène, ont été retrouvés pour des souches de virus aphteux de type A et C qui ont été de la même manière adaptés au lapin adulte puis clonés en culture cellulaire. Nous cherchons à isoler de tels mutants directement à partir de souches de virus aphteux sauvages.

Nous entrepenons une étude biochimique des mutants non pathogènes du virus aphteux. A partir du virus purifié et concentré nous réalisons une série d'épreuves biophysiques (chromatographie, électrophorèse) pour mettre en évidence des différences entre les capsides des divers groupes de mutants. D'autre part nous cherchons à isoler les ARN polymerases des divers types de mutants et à préciser leurs conditions de fonctionnement in vitro : cela en vue de faire apparaître des différences qualitatives entre l'enzyme provenant d'un mutant chaud et l'enzyme provenant d'un virus froid.

Enfin une étude génétique des mutants et en particulier des expériences de recombinaison devraient permettre de localiser les diverses mutations observées, de préciser les rapports entre les divers groupes de mutants et contrôler la stabilité des propriétés des virus employés comme vaccins. Les conditions de sélection des mutants et les techniques à mettre en oeuvre pour les obtenir plus rapidement (agents mutagènes) constitueront une application pratique de ces études génétiques.

C O N C L U S I O N

Nous avons voulu préparer des souches de virus aphteux capables, de se multiplier chez le boeuf et chez le porc sans provoquer de lésion ou de manifestation clinique, tout en suscitant l'immunité.
Nous rapportons ici la méthode utilisée pour isoler les mutants du virus aphteux de type O. Les mêmes résultats ont été obtenus par les mêmes moyens avec une souche de type A et une souche de type C.

OBTENTION DES MUTANTS NON PATHOGENES

Le virus sauvage a été passé en série sur lapins de plus en plus âgés (de I jour jusqu'à 90 jours) ; nous avons ainsi sélectionné des mutants qui se multiplient intensément dans les muscles du boeuf, du porc et de la souris adulte mais ne provoquent pas d'aphtes.
Le virus lapinisé a été cultivé sur cellules de rein de porc à 37°, à 29° et à 22°, que nous appelons respectivement 037, 029 et 022. La souche 037 qui se multiplie bien dans les muscles du boeuf et du porc est encore pathogène. La souche 029 se multiplie sans provoquer de lésion chez le boeuf, mais reste pathogène pour le porc. La souche 022 qui se multiplie mal chez les animaux naturellement ou expérimentalement sensibles n'a aucun pouvoir pathogène.

Nous avons isolé des clones à partir de la souche lapinisée et à partir de la souche "29".

LES PROPRIETES DES MUTANTS DU VIRUS APHTEUX

Cinquante clones de virus préparés par la technique des dilutions limites ont été étudiés : dans ce travail nous rapportons les résultats concernant 4 clones jugés comme particulièrement représentatifs.

Ces mutants ont conservé une structure antigénique identique ou tout au moins voisine de celle du virus d'origine : leur multiplication chez l'animal suscite l'apparition d'une immunité contre la souche pathogène homologue et l'on retrouve dans le sérum des anticorps neutralisant spécifiquement le virus de même type.

Les mutants se caractérisent par un certain nombre de facteurs d'identification qui les distinguent de la souche sauvage aussi bien in vitro qu'in vivo.

A - In vitro

Le développement des mutants non pathogènes est beaucoup plus sensible aux températures élevées que celui du virus d'origine: le "rt" du virus sauvage est 39°8, le "rt" des mutants est toujours plus bas : 38°7 pour le clone 74I, 35° pour le clone D; incubés à la même température la production du virus par unité de temps est toujours plus grande pour le virus sauvage que pour les virus non pathogènes, même si le nombre total de virions produits par cellule infectée est le même; ce caractère s'accentue pour les virus dont le "rt" est inférieur à 37°. Ce fait suggère des différences qualitatives au niveau des enzymes qui interviennent dans la synthèse du virus.

Les particules virales non pathogènes ont une capside plus fragile que le virus sauvage : les mutants perdent leur pouvoir infectieux lorsqu'on les expose à des solutions acides (pH 6,4) ou à la chaleur (55°), alors que dans les mêmes

conditions la souche d'origine garde toute son infectiosité.

B - In vivo

Le comportement des virus chez les animaux naturellement sensibles est en corrélation étroite avec les caractères manifestés in vitro.

- Le virus sauvage a une capside très solide (groupe 0) et un "rt" de 39°8 ; il se multiplie intensément chez le boeuf et chez le porc, provoque des lésions primaires et une généralisation de l'infection ; il est très contagieux.

- Les mutants dont la capside est fragile (groupe 2) et qui ont un "rt" supérieur à 38°, ainsi que les mutants dont la capside est solide (groupe I) et qui ont un "rt" de 37°5 peuvent provoquer des lésions locales lorsqu'on les inocule par voie intradermique chez le porc, mais le boeuf inoculé ne présente pas d'aphtes (virus 74I, virus I2I75).

- Les mutants dont la capside est fragile (groupe 2) et qui ont un "rt" de 36° se multiplient chez le boeuf et chez le porc sans provoquer de lésions ; ils ne sont pas contagieux et sont immunigènes (virus I63).

- les mutants dont la capside est très fragile (groupe 3) et qui ont un "rt" de 35° sont incapables de se multiplier chez le boeuf et chez le porc (virus D).

Cette corrélation met en évidence les deux composantes du pouvoir pathogène du virus aphteux : d'une part la capacité de multiplication à température élevée qui conditionne le développement intracellulaire du virus dans l'organisme animal, d'autre part la stabilité de la capside qui rend

compte de la diffusion du virus dans l'organisme infecté et donc de la généralisation de l'infection, de sa persistance dans le milieu extérieur et donc de sa contagiosité. Les mêmes caractères déterminent les propriétés que l'on doit attendre d'un mutant destiné à immuniser l'animal sans provoquer de signe clinique.

La stabilité des caractères des mutants a été étudiée : In vitro si l'on maintient un virus à une température supra optimale pendant plusieurs cycles de développement on sélectionne des virus dont le "rt" est plus élevé et dont la capside est plus solide que celle du mutant de départ. Par contre in vivo le mutant non pathogène qui a subi six passages de boeuf à boeuf conserve tous ses facteurs d'identification.

Nous avons ainsi souligné les relations qui existent entre la structure du virus et son pouvoir pathogène. L'étude des mutants et des conditions de leur sélection nous permettra d'établir la carte génétique du virus aphteux.

-=-=-=-=-

B I B L I O G R A P H I E

B I B L I O G R A P H I E

I - ARAMBURU, H. G. A comparison of different methods of inoculating guinea pigs with the virus of foot-and-mouth disease.
J. comp. Pathol. I949, 59, 42.

2 - ARLINGHAUS, R. B., POLATNICK, J. et VAN DE WOUDE, G. F. Studies on foot-and-mouth disease virus RNA synthesis.
Virology, I966, 30, 54I.

3 - ASSO, J. Pouvoir pathogène du virus aphteux lapinisé souche "loupoigne" : culture in vitro sur cellules de première explantation.
Bull. Off. int. Epiz. I96I, 55, I406.

4 - ASSO, J. Données récentes sur le virus aphteux.
Pathol. Biol. I964, I2, 2I8.

5 - ASSO, J., AYNAUD, J. M. et GOHRE, D. Rapports entre la résistance à la chaleur et le pouvoir pathogène pour le porc de différents clones du virus aphteux.
C. R. Acad. Sci. Paris, I966, 262, I604.

6 - ASSO, J., AYNAUD, J.M. et PLART, M. F. Etude de mutants de virus aphteux obtenus par culture à basse température.
Ann. Inst. Pasteur, Paris, I966, IIO, 233.

7 - ASSO, J., AYNAUD, J. M. et PORTALIER, R. Sensibilité à l'acidité des souches de virus aphteux non pathogènes pour le porc.
C. R. Acad. Sci. Paris, I966, 262, 585.

8 - ASSO, J., HAAG, J., AYNAUD, J. M., TAPIERO, H. et DHENNIN, L. Multiplication de virus aphteux virulent et atténué sur culture de premier explant et sur couche cellulaire de rein de porc.
Bull. Off. int. Epiz. I964, 6I, 67I.

9 - ASSO, J., PARAF, A., AYNAUD, J.M. et DHENNIN, L. Etude à l'aide de quelques marqueurs génétiques de la stabilité d'une souche de virus aphteux modifié de type O.
Bull. Off. int. Epiz. I964, 6I, 629.

IO - ASSO, J., PARAF, A., VERGE, J., DHENNIN, L., DHENNIN, L. et TAPIERO, H. Multiplication simultanée chez le boeuf de deux souches de virus aphteux modifiées.
Ann. Inst. Pasteur, Paris, I964, I06, I68.

II - BACHRACH, H. L. Optimum conditions for the partial fractionation by ultracentrifugation of guinea pig lymph diseased with foot-and-mouth disease virus into infectious and complement fixing components.
Acta pathol. microbiol. scand. I950, 27, 902.

I2 - BACHRACH, H. L. The determination of the sedimentation constant of a homogeneous component having the characteristics of the foot-and-mouth disease virus.
Amer. J. vet. res. I952, I3, I3.

I3 - BACHRACH, H. L. Foot-and-mouth disease virus : stability of its ribonucleic acid core to acid and to heat.
Biochem. Biophys. res. Communs. I959, I, 356.

I4 - BACHRACH, H. L. Ribonucleic acid of foot-and-mouth virus : its preparation, stability, and plating efficiency on bovine-kidney cultures.
Virology, I960, I2, 258.

I5 - BACHRACH, H. L. Thermal degradation of foot-and-mouth disease virus into infectious RNA.
Proc. Soc. exp. Biol. I96I, I07, 6I0.

I6 - BACHRACH, H. L. Foot-and-mouth disease virus structure and mechanism of degradation as deduced from absorbance-temperature relationships.
J. Mol. Biol. I964, 8, 348.

I7 - BACHRACH, H. L. Foot-and-mouth disease virus structural changes during reactions with cations and formaldelyde as deduced from absorbance measurements.
Virology, I965, 25, 532.

I8 - BACHRACH, H. L. et BREESE, S. S. Purification and electron microscopy of foot-and-mouth disease virus.
Proc. Soc. exp. Biol. N. Y. I958, 97, 659.

I9 - BACHRACH, H. L., BREESE, S. S., Jr., CALLIS, J. J., HESS, W.R. et PATTY, R.E. Inactivation of foot-and-mouth disease virus by pH and temperature changes and by formaldehyde.
Proc. Soc. exp. Biol. N. Y. I957, 95, I47.

20 - BACHRACH, H. L., CALLIS, J. J., HESS, W.R. et PATTY, R. E. A plaque assay for foot-and-mouth disease virus and kinetics of virus reproduction.
Virology, I957, 4, 224.

21 - BACHRACH, H. L., HESS, W.R., et CALLIS, J. J. Foot-and-mouth disease virus : its growth and cytopathogenicity in tissue culture. Science. 1955, 122, 1269.

22 - BACHRACH, H. L., PATTY, R. E. et PLEDGER, R.A. Thermal-resistant populations of foot-and-mouth disease virus. Proc. Soc. exp. Biol. N.Y. 1960, 103, 504.

23 - BACHRACH, H. L., TRAUTMAN, R. et BREESE, S. Chemical and physical properties of virtually pure foot-and-mouth disease virus. Amer. J. Vet. Res. 1964, 25, 333.

24 - BAUER, K. Preparation of pure lines of foot-and-mouth disease virus by the plaque method. Zbl. Bakt. Parasitkde I. Orirg. 1966, 199, 349.

25 - BAZIN, H. Action pathogène à l'égard de différentes espèces animales du virus aphteux lapinisé. Comparaison sur oeufs embryonnés du virus C (loupoigne) normal et lapinisé. Thèse de Doct. Vét. Paris, 1961.

26 - BENGTSSON, S., DINTER, Z., et PHILIPSON, L. Genetic markers associated with virulence of foot-and-mouth disease virus. Proc. Soc. exp. Biol. N. Y. 1963, 113, 1019.

27 - BRADISH, C. J., BROOKSBY, J. B., DILLON, J. F. et NORAMBUENA, M. Ultracentrifugal studies of the infective and complement-fixing components in the virus system of foot-and-mouth disease. Proc. roy. Soc. 1952, 140, 107.

28 - BRADISH, C. J., BROOKSBY, J. B., et TSUBAHARA, H. The complement fixation test in studies of components of the virus system of foot-and-mouth disease and its antibodies. J. gen. Microbiol. 1960, 22, 392.

29 - BRADISH, C. J., FARLEY, J. O. et FERRIER, H. E. M. Studies on the nature of the neutralization reaction and the competition for neutralizing antibodies between components of the virus system of foot-and-mouth disease virus. Virology, 1962, 18, 372.

30 - BRADISH, C. J., HENDERSON, W. M. et KIRKHAM, J. B. Concentration and electron microscopy of the characteristic particles of foot-and-mouth disease. J. gen. Microbiol. 1960, 22, 379.

31 - BREESE, S. S. et BACHRACH, H. L. Identification and subsequent studies of foot-and-mouth disease virus.
IV. Int. Kong. Elektronenmikro. 1960, 2, 619.

32 - BREESE, S. S. et TRAUTMAN, R. Free diffusion measured by biological assay in multilayered cells. II. Diffusion coefficient of foot-and-mouth disease virus determined by infectivity.
Analyt. Biochem. 1960, 1, 307.

33 - BREESE, S. S., TRAUTMAN, R. et BACHRACH, H. L. Analysis by electron microscopy and infectivity of foot-and-mouth disease virus in moving boundary and zone ultracentrifugation.
Arch. Biochem. 1960, 87, 1.

34 - BREESE, S. S., TRAUTMAN, R. et BACHRACH, H. L. Rotational symetry in foot-and-mouth disease virus and models.
Science, 1965, 150, 1303.

35 - BROOKSBY, J. B. Strains of the virus of foot-and-mouth disease showing natural adaptation to swine.
J. Hyg. 1950, 48, 184.

36 - BROOKSBY, J. B. The technic of complement fixation in foot-and-mouth disease virus research.
1952, ARC report n° 12, London HMSO.

37 - BROWN, J. et CARTWRIGHT, B. Fractionation of the virus of foot-and-mouth disease by chromatography on DEAE-cellulose.
Biochim. biophys. Acta, 1959, 33, 343.

38 - BROWN, F. et CARTWRIGHT, B. Purification of the virus of foot-and-mouth disease by fluorocarbon treatment and its dissociation from neutralizing antibody.
J. Immunol. 1960, 85, 309.

39 - BROWN, F. et CARTWRIGHT, B. Dissociation of foot-and-mouth disease virus into its nucleic acid and protein components.
Nature, Lond. 1961, 192, 1163.

40 - BROWN, F. et CARTWRIGHT, B. Purification of radioactive foot-and-mouth disease virus.
Nature, 1963, 199, 1168.

41 - BROWN, F. et CARTWRIGHT, B. Virus specific RNA in BHK cells infected with foot-and-mouth disease virus.
Nature, 1964, 204, 855.

42 - BROWN, F., CARTWRIGHT, B. et NEWMAN, J. F. E. Further studies on the early antibody in the sera of cattle and guinea pigs infected with foot-and-mouth disease virus.
J. Immunol. 1964, 92, 397.

43 - BROWN, F., CARTWRIGHT, B. et STEWART, D. L. Mechanism of infection of pig kidney cells by foot-and-mouth disease virus.
Biochim. biophys. Acta, 1961, 47, 172.

44 - BROWN, F., CARTWRIGHT, B. et STEWART, D. L. Further studies on the infection of pig kidney cells by foot-and-mouth disease virus.
Biochim. biophys. Acta., 1962, 55, 768.

45 - BROWN, F., CARTWRIGHT, B. et STEWART, D. L. The effect of various inactivating agents on the viral and RNA infectivities of foot-and-mouth disease virus and on its attachment to susceptible cells.
J. gen. Microbiol. 1963, 31, 179.

46 - BROWN, F. et CRICK, J. Application of agar gel precipitin tests to the study of the virus of foot-and-mouth disease.
Virology, 1958, 5, 133.

47 - BROWN, F. et MARTIN, S. J. A new model for virus RNA replication.
Nature, 1965, 208, 861.

48 - BROWN, F., MARTIN, S. J. et UNDERWOOD, B. A study of the kinetics of protein and RNA synthesis by foot-and-mouth disease virus.
Biochim. biophys. Acta, 1966, 129, 166

49 - BROWN, F., PLANTEROSE, D. N. et STEWART, D. L. Effect of p-fluorophenylalanine on the multiplication of foot-and-mouth disease virus.
Nature, 1961, 191, 414

50 - BROWN, F., SELLERS, R. F. et STEWART, D. L. Infectivity of ribonucleic acid from mice and tissue culture infected with the virus of foot-and-mouth disease.
Nature, 1958, 182, 535.

5I - BROWN, F. et STEWART, D. L. Studies with infective RNA from tissue cell cultures infected with the virus of foot-and-mouth.
Virology, I959, 7, 408.

52 - BROWN, F., STEWART, D. L. et NEWMAN, J. F. E. Chromatography of infective RNA from foot-and-mouth disease virus on calcium phosphate.
Nature, I963, I97, 590.

53 - BROWN, F. et WILD, T. F. The effect of heat on the structure of foot-and-mouth disease virus and the viral RNA.
Biochim. biophys. Acta, I966, II9, 30I.

54 - BURGE, B. W. et PFEFFERKORN, E. R. Isolation and characterization of conditional lethal mutants of Sindbis Virus.
Virology, I966, 30, 204.

55 - BURROWS, R. Studies on the carrier state of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus.
J. Hyg. I966, 64, 8I.

56 - CHMAND, R. La fixation du complément.
Thèse de Doc. Vét. Lyon, I953, Bosc Ed.

57 - CAPSTICK, P. B., TELLING, R. C., CHAPMAN, W. G. et STEWART, D. L. Growth of a cloned strain of Hamster kidney cells in suspended cultures and their susceptibility to the virus of foot-and-mouth.
Nature, I962, I95, II63.

58 - CARTWRIGHT, S. F., PAY, T. et HENDERSON, W. M. Multiplication of the virus of foot-and-mouth in culture.
J. gen. Microbiol. I957, I6, 730.

59 - CARTWRIGHT, S. F. et THORNE, H. V. Use of two properties of the foot-and-mouth disease virus in studies of its multiplication.
Nature, I958, I82, 7I7.

60 - CARTWRIGHT, S. F. et THORNE, H. V. Some application of detergent to the study of foot-and-mouth disease virus.
J. gen. Microbiol. I959, 20, 6I.

6I - CIACCIO, G. Comparaison des réaction du cobaye à l'inoculation d'une souche bovine de virus aphteux de type C adaptée en même temps au cobaye et à la souris de 24 à 30 jours.
Ann. Inst. Pasteur, Paris, I963, I04, 529.

62 - COWAN, K. M. et GRAVES, J. H. A third component associated with foot-and-mouth disease virus infection.
Virology, I966, 50, 528.

63 - CRICK, E. J., LEBEDEV, A. I., STEWART, D. L. et BROWN, F. The assay, extraction and storage of infective RNA from foot-and-mouth disease virus.
J. gen. Microbiol. I966, 43, 59.

64 - CUNHA, R. G. et EICHHORN, E. A. Study of foot-and-mouth disease virus adapted to the rabbit.
Amer. J. vet. res. I959, 20, I33.

65 - CUNHA, R. G., TORTURELLA, I., BERNAL, C.L. et HONIGMAN, M.N. quelques aspects de l'application du vaccin anti-aphteux à virus vivant atténué.
Bull. Off. int. Epiz. I962, 57, 733.

66 - CUNHA, R. G., TORTURELLA, I. et SERRAO, U.M. Studies of the foot-and-mouth disease virus adapted to the rabbit. II. Immunogenicit
Amer. J. vet. res. I959, 20, I38.

67 - DAVIE, J.A. A complement fixation technic for the quantitative measurement of antigenic differences between strains of foot-and-mouth disease virus.
J. Hyg. I964, 62, 40I.

68 - DE BOER, C. J. et BACHRACH, H. L. The multiplication of foot-and-mouth disease virus in trypsinized calf kidney and tongue cell and its use as immunizing and complement fixing antigens.
J. Immunol. I96I, 86, 282.

69 - DEMNITZ, A. Du vaccin aphteux préparé avec du virus de l'oeuf de poule.
Bull. Off. int. Epiz. I95I, 35, 577.

70 - DESMOULINS, J. Multiplication du virus aphteux chez le lapin.
Thèse de Doc. Vét. Alfort, I963.

7I - DHENNIN L. Recherches biologiques sur la culture du virus de la fièvre aphteuse.
Thèse Doct. Sci. Paris, I952.

72 - DHENNIN, L. La culture du virus de la fièvre aphteuse en très grande quantité sur embryome spécifique géant chez la vache.
C. R. Acad. Sci. Paris, I952, 235, 420.

73 - DICK, P. R. Modifications subies par une souche de virus aphteux de type C "loupoigne" au cours de plus de I60 passages chez le lapin.
Thèse de Doct. Vét. Alfort, I960.

74 - DINTER, Z. Interférence dans le système virus de la fièvre aphteuse et cellules rénales de veau.
Bull. Off. int. Epiz. I960, 53, II0.

75 - DINTER, Z. et BENGTSSON, S. Suppression of the inhibitory action of guanidine on virus multiplication by some amino acid.
Virology, I964, 24, 254.

76 - DINTER, Z., PHILIPSON, L. et WESSLEN, T. Persistant foot-and-mouth disease infections of cells in tissue culture.
Virology, I959, 8, 542.

77 - DUBES, G. R. et CHAPIN, N. Cold adapted genetic variants of polioviruses.
Science, I956, I24, 586.

78 - FAYET, M. T. La courbe d'inactivation du virus aphteux par la -propiolactone ; comparaison avec d'autres agents d'inactivation.
Ann. Inst. Pasteur, Paris, I967, II2, I45.

79 - FAYET, M. T., FONTAINE, J., TERRE, J. et ROUMIANTZEFF, M. Utilisation de la β -propiolactone comme agent d'inactivation pour la préparation de vaccins contre la fièvre aphteuse.
Ann. Inst. Pasteur Paris, I967, II2, 66.

80 - FAYET, M. T., ROUMIANTZEFF, M., DUBOUCLAID, C. et FONTAINE J. Utilisation d'un fluorocarbone comme méthode d'étude du virus de la fièvre aphteuse.
Ann. Inst. Pasteur Paris, I965, I09, 652.

8I - FELLOWES, O. N. Chemical inactivation of foot-and-mouth disease virus.
Ann. N. Y. Acad. Sci., I960, 83, 595.

82 - FELLOWES, O. N., EDWARD, A. G., TESSLER, J., POPPENSIEK, G. C. et SHARP, J. B. The inactivation of foot-and-mouth disease virus, type A-II9, with β -propiolactone.
Amer. J. vet. res. I959, 20, 992.

83 - FONTAINE, J. et ROUMIANTZEFF, M. Etudes immunologiques et sérologiques de types et de variantes du virus aphteux.
Bull. Off. int. Epiz. I964, 6I, 9.

84 - FRENKEL, H. S. La culture du virus de la fièvre aphteuse sur l'épithélium de la langue des bovidés.
Bull. Off. int. Epiz. I947, 28, I55.

85 - FRENKEL, H. S. Research on foot-and-mouth disease. III. The cultivation of the virus on a practical scale in explantation of bovine tongue epithelium.
Amer. J. vet. res. I95I, I2, I87.

86 - GARBE, H. G., PILZ, W. et ARMBRUSTER, O. Observations sur les réactions chez le boeuf, après l'administration de souches atténuées de virus aphteux.
Bull. Off. int. Epiz. I964, 6I, 749.

87 - GIERER, A. et SCHRAMM, G. Infectivity of RNA from tobacco masaïc virus.
Nature. I956, I77, 702.

88 - GILLESPIE, J. H. The propagation and effects of type A foot-and-mouth disease virus in the day-old chick.
Cornell Vet. I954, 44, 425.

89 - GILLESPIE, J. H. Further studies with foot-and-mouth disease viruses in day-old chicks.
Cornell Vet. I955, 45, I60.

90 - GILLESPIE, J. H. Propagation of type C foot-and-mouth disease virus in eggs and effects of the egg-cultivated virus in cattle.
Cornell Vet. I955, 45, I70.

9I - GIRARD, H. et MACKOWIACK, C. La culture du virus aphteux au stade industriel.
Rev. Immunol. I953, I7, 224.

92 - GOLDSMIT, L. et BARZILL, E. Differences between some growth characteristics of attenuated and virulent foot-and-mouth disease virus strains.
Bull. Off. int. Epiz. I964, 6I, 8I9.

93 - GORHE, D., ASSO, J. et AYNAUD, J. M. Studies on the relationship of the thermosensibility and sensibility to the acidic pH of certain clones of foot-and-mouth disease virus obtained at infra-optimal temperature of 29° C.
Indian Vet. J. I966, 43, 935.

94 - GRIBANOV. A. Résultats de l'épreuve du vaccin antiaphteux VIEV préparé avec un virus adapté au lapin.
Bull. Off. int. Epiz. I955, 43, 632.

95 - GUILLOT, P. Culture du virus de la fièvre aphteuse sur cellule de rein de porc.
Ann. Inst. Pasteur, Paris, I957, 93, 8I.

96 - HAAG, J. et SANTUCCI, J. Etablissement d'une souche cellulaire diploïde de rein de porc.
C. R. Acad. Sci. Paris, I962, 255, I485.

97 - HANTSCHEL, H. Infecktiose ribonukleinsaure aus neurotropen modifizierten maul und klauenseuche virus typ A.
Arch. exp. vet. Med. I963, I7, 263.

98 - HANTSCHEL, H. et VECKENSTED, A. Infecktiose ribonukleinsaure aus neurotropen varianten des maul und klauenseuche virus.
Arch. exp. vet. Med. I964, I8, 409.

99 - HECKE, F. Zücktung versuche des maul und klauenseuche virus in Gewebe kulturen.
Zbl. Bakt. (I. Abt. Orig.) I930, II6, 386.

IOO - HECKE, F. Westere Mitteilungen uber die Kunstiliche wermebrung des maul und klauenseuche virus in Gewebe kulturen.
Zbl. Bakt. (I. Abt. Orig.) I93I, II9, 385.

IOI - HENDERSON, W. M. A comparison of different routes of inoculation of cattle for detection of the virus of foot-and-mouth disease
H. Hyg. I952, 50, I82.

IO2 - HENDERSON, W. M. et CUNHA, R. G. Research on the development of a modified live virus vaccine in foot-and-mouth disease.
Proc. XVI int. vet. Congr. I959, 2, 395.

I03 - HENDERSON, W. M., GALLOWAY, I. A. et BROOKSBY, J. B. Strains of virus of foot-and-mouth disease recovered from outbreaks in Mexico. Pathogenicity and invasiveness.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. I948, 69, 77.

I04 - KHERA, M. et MAURIN, J. Etude par la méthode des plages du virus aphteux de type C en couche monocellulaire de rein de porcelet.
Ann, Inst. Pasteur Paris, I958, 95, 557.

I05 - KOMAROV, A. La vaccination antiaphteuse des bovins utilisant un vaccin avianisé.
Revue Elev. Méd. vét. Pays trop. I958, 4, 470.

I06 - KOMAROV, A. et GOLDSMIT, L. Avianized modified foot-and-mouth disease viruses.
Bull. res. Council Israël, I958, 7E, 2I7.

I07 - KOTSCHE, W. et VECKENSTEDT, A. Zum problem der aupassung des maul und klauenseuche virus au das Zentral nerven system der maus.
Archs. exp. vet. Med. I959, I3, 40.

I08 - LEUNEN, J., STROBBE, R. et WILLEMS, R. Modification des caractères d'une souche de virus aphteux par passages en culture.
Bull. Off. int. Epiz. I960, 53, I506.

I09 - LEVADITI, C. Une souche neurotrope du virus de la fièvre aphteuse.
C. R. Soc. Biol. I942, I36, 477.

II0 - LODDO, B. et MEDDA, A. Croissance du virus aphteux sur culture primaire de cellules rénales de cobaye adulte.
Vet. ital. I962, II, 659.

III - LOEFFLER, F. et FROSCH, P. Summarischer Bericht Uber die Ergebnisse der Unter-suchungen der Kommission zur Erforshung der maul und klauenseuche.
Zbl. Bakt. Parasittenk. Orig. I897, 22, 257, et 23, 37I.

II2 - LOMBARD, A., GUARINI, G. et DECKERS C. Le virus de la fièvre aphteuse : étude de son acide ribonucléique.
Ann. Inst. Pasteur Paris, I967, II2, I37.

II3 - LWOFF, A. Mutations affecting neurovirulence in poliomyelitis.
5ème Cong. int. Poliomyélite, Leppincot Copenhagen, I96I Ed. I9.

II4 - LWOFF, A. et LWOFF, M. Remarques méthodologiques à propos de la thermosensibilité du développement viral.
Ann. Inst. Pasteur Paris, I96I, IOI, 3I3.

II5 - MACKOWIACK, C. Modification d'un virus aphteux de type C par passage sur souris adulte : perte du pouvoir pathogène pour les bovins.
C. R. Acad. Sci. Paris, I962, 254, 4097.

II6 - MACKOWIACK, C., CAMAND, R., FONTAINE, J., GILBERT, H., LANG, R et PETERMAN, H. G. Modification du virus aphteux type C par passages sur souris adultes. Etat actuel des recherches.
Bull. Off. int. Epiz. I964, 6I, 679.

II7 - MAITLAND, M. C. et MAITLAND, H. B. Cultivation of foot-and-mouth disease virus.
I93I - 4 th report Comm. Lond. H. M. S. O.

II8 - MAMMERIXCK, M. et LEUNEN, J. The culture of BHK cells on an industrial scale by roll flasks.
Bull. Off. int. Epiz. I966, 65, 33I.

II9 - MASTAN, M. B. Modification of an iranian strain by passage on mice.
Bull. Off. int. Epiz. I964, 6I, 727.

I20 - MAYR, A. et WITTMANN, G. Préparation d'un vaccin antiaphteux à partir du virus modifié par passages continus sur cultures de cellules.
Zbl. vet. Med. I960, 7, 829.

I2I - MOWAT, G. N. Selection of attenuated strains of foot-and-mouth disease virus by cloning in tissue culture.
Bull. Off. int. Epiz. I964, 6I, 639.

I22 - MOWAT, G. N. et CHAPMAN, W. G. Growth of foot-and-mouth disease virus in a fibroblastic cell line derived from hamster Kidney.
Nature, I962, I94, 253.

I23 - MUSSGAY, M. Uber den Mechanismus der pH-inaktivierung des virus der maul und klauenseuche Monatsh. Tierheilk, II, I85.

I24 - MUSSGAY, M. Gewinnung einer pH-stabilen variante des virus der maul und klauenseuche und ihre Vermehrung Gewebelkulturen mit sauren medium.
Zbl. Backt. Parasitenk. Abt. I. Orig. I959, I75, I83.

I25 - MUSSGAY M.et STROHMAIER, K. Gewinnung cines infektiösen prinzips von ribonukleinsäure charakter aus homagenaten mit dem maul und klauenseuche virus infizierter jungmäuse
Zbl. Bakt. I958, I73, I63.

I26 - NAGEL, H. C. Untersuchungen uber das verhalten des maul und klauenseuche virus in zentral nerven system kleiner Versuchtiere.
Dtsch. tierätzl Wschr. I937, 45, 624.

I27 - NAGEL, H. C. El comportamiento del virus aftoso en animales lactantes de diferentes especies.
Gac. vet. I952, I4, 52.

I28 - NAGEL, H. C. et PETERMAN, H. El comportamiento del virus aftoso en el embrion de pollo.
Gac. vet. I952, I4, 73.

I29 - PALACIOS GARCIA, C. A. Adaptacion del virus aftoso tipo O Vallée Cepa Lara, a pollo de un dia de edad.
Boln. inf. Invest. vet. Maracay I957, 9, II.

I30 - PALACIOS GARCIA, C. A. Investigaciones realizadas con los virus atenuados de la fiebre aftosa de los tipos O y A vallée en Venezuela.
Bull. Off. int; Epiz. I964, 6I, 757.

I3I - PALACIOS, L. F. et FUENTES, R.A. Recherches sur l'avianisation du virus de la fièvre aphteuse souche Lara.
Bull. Off. int. Epiz. I960, 53, 6II.

I32 - PALACIOS GARCIA, C. A., FUENTES, R. A., MARCUS, S., CASTENEDA GARCIA, et MALDONADO, A. Avianization del virus de la fiebre aftosa, tipo O Vallée Cepa Lara de Venezuela.
Ier Cong. Panamericano de Biol. y Patol. exp. I960.

I33 - PARAF, A., ASSO, J., FOUGEREAU, M. et VERGE, J. Multiplication d'une souche de virus aphteux chez deux lignées consanguines de souri
C.R. Acad. Sci. Paris, I96I, 252, 2328.

I34 - PARAF, A., ASSO, J., FOUGEREAU, M., VERGE, J., DHENNIN, L. et DHENNIN L. Vaccination des bovins à l'aide d'un virus aphteux vivant.
Arch. exp. vet. Med. I96I, I5, 323.

I35 - PARAF, A., ASSO, J. FOUGEREAU, M. , VERGE, J., DHENNIN, L. et DHENNIN L. Propriétés pathogènes et immunigènes du virus aphteux passé en série en cultures de tissus.
C. R. Acad. Sci. Paris, I96I, 253, 327.

I36 - PARAF, A., ASSO, J., VERGE, J., DHENNIN, L., DHENNIN, L., DICK, P. et DESMOULINS, J. Modification de certaines propriétés biologiques du virus aphteux observées au cours de plus de cent passages chez le lapin.
Bull. Off. int. Epiz. I958, 49, 546.

I37 - PARAF, A., VERGE, J. et ASSO, J. Modifications de la virulence d'une souche de virus aphteux par passages successifs chez le lapin.
C.R. Acad. Sci. I958, 246, 3690.

I38 - PARAF, A., VERGE, J., DHENNIN, L., DHENNIN, L. et ASSO, J. Etude quantitative des propriétés immunigènes du virus aphteux lapinisé : vaccination antiaphteuse avec du virus vivant chez les bovins.
C. R. Acad. Sci . Paris, I959, 258, I455.

I39 - PAY, T. W. F. Growth of bovine amniotic ectoderm as a cell monolayer on glass and its use as a system for virus multiplication.
Nature, I956, I77, 752.

I40 - PAY, T. W. F., FERRIS. R. D. et BRACEWELL, C. D. The use of a "plaque-purified" clone derived from a modified foot-and-mouth disease virus strain as a living vaccine.
Bull. Off. int. Epiz. I964, 6I, 65I.

I4I - PEREIRA DE CASTRO. Behaviour of foot-and-mouth disease virus in cell cultures : susceptibility of the IB-RS-2 cell line.
Arqs. Inst. biol. S. Paulo I964, 3I, 73.

I42 - PETEFMAN, H. G., FONTAINE, J., CAMAND, R. et LEPHTERIOTIS E. Modifications d'une souche de virus aphteux.
C. R. Acad. Sci. Paris, I960, 25I, I845.

I43 - PLANTEROSE, D. N. Effects of inhibition on the metabolism of cells in tissue culture and on foot-and-mouth disease virus synthesis
Biochim. biophys. Acta, I96I, 53, I86.

I44 - PLANTEROSE, D. N. et RYAN, J. K. O A 65 S particule containing viral protein in cells infected with foot-and-mouth disease virus.
Virology, I965, 26, 372.

I45 - PLEDGER, R. A. Formation and release of foot-and-mouth disease virus from bovine kidney cell cultures.
Virology, I96I, I3, 365.

I46 - POLATNICK, J. Studies on the small particle complement-fixing antigen of foot-and-mouth disease virus.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. I960, I03, 27.

I47 - POLATNICK, J. et BACHRACH, H. L. Metabolic studies of bovine kidney cultures infected with foot-and-mouth disease virus.
Virology, I960, I2, 450.

I48 - POLATNICK, J. et BACHRACH, H. L. Production and purification of milligram amounts of foot-and-mouth disease virus from baby hamster kidney cell cultures.
Appl. Microbiol. I964, I2, 368.

I49 - POPLEWSKA, J. et ASSO J. Transmission du virus aphteux des souriceaux nouveau-nés expérimentalement infectés aux mères allaitantes. Conséquences immunologiques.
Bull. Acad. Vet. I962, 255, 2852.

I50 - PRINGLE, C. R. Inhibition of foot-and-mouth disease virus by guanidine H Cl.
Nature, I964, 204, IOI2.

I5I - PRINGLE, C. R. Evidence of genetic recombination in foot-and-mouth disease virus.
Virology, I965, 25, 48.

I52 - PRUNET, P. Modifications du comportement des virus aphteux lors de passages successifs en culture de tissus à diverses températures.
Ann. Inst. Pasteur Paris, I964, I06, I8.

I53 - PRUNET, P., CAUCHY, L., DURAND, M. et POUL, J. Observations sur les marqueurs génétiques appliqués aux virus aphteux.
Bull. Off. int. Epiz. I964, 6I, 607.

I54 - PYL, G. Dispersität und sedimentationskonstante des neurotrop modifizierten standard a maul und klauenseuche virus der wissen maus.
Arch. exp. vet. Med. I956, I0, 358.

I55 - RANDRUP, A. Ultracentrifugation of the virus of foot-and-mouth disease virus. III. Verification of the existence of two particles of different size carrying the complement-fixing antigen.
Acta Pathol. Microbiol. Scand. I954, 34, 355.

I56 - RANDRUP, A. On the stability of bovine foot-and-mouth disease virus dependant on pH investigation on the complement-fixing and immunizing antigen as well on the infective agent.
Acta Pathol. Microbiol. Scand. I954, 35, 388.

I57 - ROHRER, H. Die intrazerebrale ubertragung der typen A, B, C des maul und klauenseuche virus auf die weibliche maus.

I58 - SCHULZE, P. et GRALHEER, H. Visualization of capsomere of foot-and-mouth disease virus.
Acta virol. Prague, I964, 8, 473.

I59 - SCHJERNING, THISEN, K. Differenciation of virus type in foot-and-mouth disease.
Acta vet. scand. I964, 5, I33.

I60 - SEIBOLD, H. R., COTTRAL, G. E., PATTY, R. E. et GAILIUNAS, P.C. Apparent modification of foot-and-mouth disease virus after prolonged residence in surviving cells.
Amer. J. vet. res. I964, 25, 806.

I6I - SELLERS, R. F. Growth and titration of the viruses of foot-and-mouth disease and vesicular stomatitis in kidney monolayer tissues cultures.
Nature, I955, I76, 547.

I62 - SELLERS, R. F. The growth and antigenicity of the virus of foot-and-mouth disease in pig kidney cells tissue culture.
Arch. ges. Virusforsch. I959, 9, 62I.

I63 - SELLERS, R. F. Multiplication, interferon production and sensitivity of virulent and attenuated strains of foot-and-mouth disease virus.
Nature, I963, I98, I228.

I64 - SELLERS, R. F., BURT, L. M., CUMMIN, A. et STEWART, D. L. The behaviour of strains of foot-and-mouth disease virus in pig, calf, ox and lamb kidney tissue culture.
Arch. ges. Virusforsch. I960, 9, 637.

I65 - SELLERS, R. F., et STEWART, D. L. Factors affecting the formation of plaques by the foot-and-mouth disease virus on pig monolayer tissue culture.
Arch. ges. Virusforsch. I959, 9, 594.

I66 - SERGEEV, V. A., LAVROVA, T. S., LEITSEVITCH, F.F., FEDOROVA,T.I et SJUSJUKINA, M. Changes in the pathogenicity of the foot-and-mouth disease virus after prolonged passage in tissue culture.
Veterinariya, Moscou, I963, 40, 7I.

I67 - SHARAN, M. S. The virus of foot-and-mouth disease.
Ann. N. Y. Acad. Sci. I962, IOI, 444.

I68 - SHISHKINA, K. A. Growth of foot-and-mouth disease virus in tissue culture.
Veterinariya, Moscou, I965, 42, I7.

I69 - SKINNER, H. H. Propagation of strains of foot-and-mouth disease virus in unweaned white mice.
Proc. Roy. Soc. Med. I95I, 44, IO4I.

I70 - SKINNER, H. H. Infection of chickens and chick embryos with the foot-and-mouth disease virus and vesicular stomatitis virus.
Nature, I954, I74, IO52.

I7I - SKINNER, H. H. Infection of domestic poultry with the viruses of foot-and-mouth disease and vesicular stomatitis.
Arch. ges. Virusforsch., I959, 9, 92.

I72 - SKINNER, H. H. The immunogenicity of strains of foot-and-mouth disease virus modified by several passages in white mice and chick embryos.
C.R. I6ème Cong. vet. int. Madrid, I959, 2, 39I.

I73 - SKINNER, H. H. Some technics for producing and studying attenuated strains of the virus of foot-and-mouth disease.
Bull. Off. int. Epiz. I960, 53, 634.

I74 - SKINNER, H. H., SMITH, I. M., HOLLOMS, S. E. et KNIGHT, E. H. Attenuated strains of foot-and-mouth disease virus. Studies in small animals with strains of common origin modified by different methods.
Arch. ges. Virusforsch. I963, I2, 472.

I75 - SNOWDON, W. A. Growth of foot-and-mouth disease virus in monolayer cultures of calf tyroïd cells.
Nature, I966, 2I0, I079.

I76 - STICE, E. PK$_2$A Cutter Laboratory, Berkeley, utilisée par THORN et CARTWRIGHT dans :
Virology, I96I, I5, 245.

I77 - STOCKER, M. G. P. et Mc PHERSON A polyoma transformation of hamster cell clones, an investigation of genetic factors affecting cell competence.
Virology, I962, I6, I47.

I78 - STROHMAIER, K. et MUSSGAY, M. Density gradient centrifugation with infectious RNA of foot-and-mouth disease virus.
Science, I959, I30, 2I7.

I79 - SUBAK-SHARPE, H. The quantitative study of foot-and-mouth disease virus in unweaned mice. I. Studies of various factors affecting quantitative analysis. II Studies with additional mouse strains and comparison of some methods of titration.
Arch. ges. Virusforsch. I96I, II, I.

I80 - SVIRIDOV, A. A., NOGENA, V. T., LUKIN, A. M. et YU, S. Testing the avirulent and immunogenic properties of Novosibirsk NIVS live foot-and-mouth vaccine.
Sb. nauch. rab. Novosibirsk vet. stants. I965, 2, 64.

I8I - THELY, M., SACH, E., DHENNIN, L., CHOAY, J., et DHENNIN, L. Préparation à l'aide de bentonite d'un ARN hautement infectieux extrait d'épithelium lingual de bovins atteints de fièvre aphteuse.
C. R. Acad. Sci. Paris, I96I, 353, 3II8.

I82 - THOMAS, J. A. et LECLERC, J. L'ARN infectieux du virus de la fièvre aphteuse.
C. R. Acad. Sci. Paris, I959, 248, 606.

I83 - THOMAS, J. A., THIERY, J. A., SALMON, L. et SALOMON L. La culture de virus de la fièvre aphteuse en très grande quantité sur embryome spécifique géant, chez la vache.
C. R. Acad. Sci. Paris, I952, 235, 520.

I84 - THORNE, H. V. The kinetics of virus penetration.
Fed. proc. I96I, 20, 437.

I85 - THORNE, H. V. et CARTWRIGHT, S. F. Reactions of the foot-and-mouth disease virus with cells and cell debris.
Virology, I96I, I5, 245.

I86 - TRAUB, E. et CAPPS, W. I. Expérimentation avec une souche de virus aphteux avianisée.
Naval Medic. res. Inst. Mem. Rep. I953, p. I5.

I87 - TRAUB, E. et PYL, G. Untersuchungen uber das komplement bindened antigen bei maul und klauenseuche.
Z. ImmunForsch. I943, I04, I58.

I88 - TRAUB, E. et SHNEIDER, B. Züchtung des maul und klauenseuche virus im Brüteten Hübnerei.
Z. Naturforsch. I948, 3b, I78.

I89 - TRAUTMAN, R. et BREESE, S. S., Jr. Isodensity ultracentrifugation of foot-and-mouth disease virus in cesium chloride.
J. gen. Microbiol. I962, 27, 23I.

I90 - TRAUTMAN, R., BREESE, S.S. et BACHRACH, H. L. Preparative ultracentrifugation of foot-and-mouth disease virus through immiscible fluid interfaces into a cesium chloride density gradient.
J. Phys. Chem. I962, 66, I976.

I9I - TRAUTMAN, R. SAVAN, M. et BREESE, S.S. Jr. Partition by zone ultracentrifugation of the two complement-fixing particles in the foot-and-mouth disease virus system.
J. Amer. Chem. Soc. I959, 8I, 4040.

I92 - UBERTINI, B. Méthodes d'identification et de culture du virus de la fièvre aphteuse.
O. E. C. E. Amsterdam, I955, 3, 28.

I93 - UBERTINI, B. Le varianti del virus aftoso.
Vet. ital. I959, 5, 395.

I94 - UBERTINI, B., NARDELLI, L., BAREI, S. et SANTERO, G. Etude sur la culture in vitro du virus aphteux selon FRENKEL.
Zbl. Vet. I956, 3, 4I9.

I95 - UBERTINI, B., NARDELLI, L., DEL PRATO, A., PANINA, G. et SANTERO, G. Large scale cultivation of foot-and-mouth disease virus on calf kidney cell monolayer in rolling bottles.
Zbl. vet. I963, I0, 93.

I96 - ULHMAN, W. Studies of a foot-and-mouth disease virus strain of type SAT_4 modified by continued passage in mice of increasing age. Zbl. Vet. Med. I964, II3, 657.

I97 - VALLEE, H. et CARRE, H. Sur la pluralité du virus aphteux. C. R. Acad. Sci. Paris, I922, I74, I498.

I98 - VAN DE WOUDE, G. F., TRAUTMAN, R. et BACHRACH, H. L. The influence of the host cell, ionic strength and chymotrypsin on foot-and-mouth disease virus electro phoretic mobility. Arch. ges. Virusforsch. I967, 20, 7I.

I99 - VAN OSS, C. J., DHENNIN, L. et DHENNIN, L. The antigenic connection between two different types of foot-and-mouth disease virus and their subparticles. Virology, I964, 22, 428.

200 - VECKLNSTEDT, A. Experimentelle erzengung neurotropen variante des maul und klauenseuche virus bei der maus. Arch. exp. Vet. Med. I96I, I6, 8I.

20I - VERGE, J., PARAF, A., et ASSO, J. Le phénomène d'adaptation spécifique des ultra-virus en fonction de l'âge des animaux. Ann. Inst. Pasteur, Paris, I959, 96, I6.

202 - VERGE, J., PARAF, A., DHENNIN, L., DHENNIN, L. et ASSO, J. Adaptation du virus aphteux au lapin nouveau-né. C. R. Acad. Sci. Paris, I957, 244, 3098.

203 - VERGE, J., PARAF, A., DHENNIN, L., DHENNIN, L. et ASSO, J. Culture du virus aphteux sur lapin nouveau-né. Modification des pouvoirs pathogène et antigène. Bull. Acad. Vet. I957, 30, 29I.

204 - VERGE, J., PARAF, A., DHENNIN, L., DHENNIN, L. et ASSO, J. Propriétés immunigènes d'une souche de virus aphteux de type C, utilisation de cette souche pour la vaccination des bovins. Bull. Off. int. Epiz. I960, 53, 6I9.

205 - WALDMANN, O., KOBE, K., et PYL, G. L'immunisation active du bovin contre la fièvre aphteuse par le vaccin formolé. Bull. Off. int. Epiz. I937, I3, 825.

206 - WALDMANN, O. et PAPE, J. Die künstiliche der maul und klauenseuche auf das meersch. Weinchen.
Berlin, tieräztl. Wochschr. I920, 36, 5I9.

207 - WALDMANN, O., et TRAUTWEIN, K. Experimentelle untersuchungen über die pluralität des maul und klauenseuchevirus.
Berlin. tieräztl. Wochschr. I926, 42, 569.

208 - WALLIS, C. et MELNICK, J. L. Cationic stabilization, a new property of entero viruses.
Virology, I962, I6, 504.

209 - WESSLEN, T. et DINTER, Z. The inactivation of foot-and-mouth disease virus by formalin.
Arch. ges. virusforsch. I957, 7, 394.

2I0 - WINDKLER, W. Adaptation of the type of foot-and-mouth disease virus to the brain of white mouse.
Acta virol. Prague, I958, 2, 3.

2II - WITTMAN, G. Antigenic and immunological relationship between the O type of foot-and-mouth disease virus.
Zbl. Bakt. I. (orig.) I964, I94, I.

2I2 - WITTMAN, G. Marqueurs génétiques de souches atténuées du virus aphteux.
Bull. Off. int. Epiz. I964, 6I, 59I.

2I3 - WITTMAN, G. Gewinnung genetisch reiner avirulenter Linien des maul und klauenseuche virus.
Arch. ges. Virusforsch. I967, 20, II9.

2I4 - ZAHRAN, G. E. D. Foot-and-mouth disease virus "Propagation and modification of three immunologic types of virus embryonated chicken eggs".
Amer. J. vet. res. I96I, 22, 5I8.